

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

PROTÉINES RELIÉES AU RÉCEPTEUR AU GLUCAGON :  
COMPARAISON DES CINÉTIQUES LORS DU JEÛNE ET DE L'EXERCICE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

DOMINIC FOUCHER

NOVEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Le projet auquel j'ai eu la chance de participer est une brique dans le grand mur que tente de bâtir le laboratoire de biochimie de l'exercice. Je me compte très chanceux d'avoir pu travailler avec des personnes intelligentes et passionnées par la recherche tout au long de ma maîtrise.

J'ai eu la chance d'apprendre d'un scientifique qui est l'exemple même de l'expression « un esprit sain dans un corps sain ». Alexandre Melançon fut pour moi d'une grande aide tout au long de mon projet et j'espère avoir la chance de travailler de nouveau avec toi.

Plusieurs étudiants-stagiaires ont fourni leur part de sueur et de temps dans ce travail et je tiens à remercier particulièrement Maude Dumont-Lagacé, Jonathan Lamanque et Katy Leduc pour leur apport exceptionnel.

Mes remerciements seraient incomplets sans mentionner les fins conseillers que sont Mmes Nadia Desnoyers, responsable de l'animalerie, Valérie Leblanc, professionnelle de recherche, Ann-Marie Fortier, étudiante au doctorat en biophysique et biologie cellulaires ainsi que Dr Monique Cadrin, ma codirectrice de projet, sans qui rien n'aurait été possible. Je me dois aussi de remercier Dr Cecille Unson de l'Université Rockefeller pour l'anticorps ST21 anti-récepteur au glucagon, ainsi que ses conseils sur son utilisation.

Finalement, je me dois de remercier ma directrice de projet, Dr Carole Lavoie pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir confié les rênes d'un si beau projet. Tu m'as permis de découvrir et d'approfondir mes compétences de chercheur, mais aussi de gestionnaire, de professeur, de vulgarisateur et d'humain.

MERCI

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ .....	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Métabolisme glucidique.....	1
1.1.1 Réserves glucidiques.....	1
1.2 Hormones responsables de la régulation glucidique.....	4
1.2.1 Insuline .....	4
1.2.2 Glucagon.....	4
1.3 Récepteur au glucagon.....	6
1.3.1 Récepteur au glucagon lors du jeûne et de l'exercice.....	8
1.4 Protéines impliquées dans la gestion du métabolisme glucidique.....	10
1.4.1 AMPK.....	10
1.4.2 LKB1 .....	14
1.4.3 Protéines de désensibilisation du récepteur au glucagon.....	16
1.4.3.1 GRK .....	17
1.4.3.2 PKC .....	17
1.4.3.3 $\beta$ -Arrestine.....	18
CHAPITRE II	
OBJECTIFS DU PROJET .....	20
CHAPITRE III	
MÉTHODOLOGIE.....	22
3.1 Protocole expérimental.....	22



3.1.1	Animaux .....	22
3.1.2	Exercice .....	22
3.1.3	Jeûne .....	23
3.1.4	Sacrifices et prélèvements des tissus .....	24
3.1.5	Préparation et isolation des membranes plasmiques.....	25
3.1.6	Préparation des hépatocytes.....	26
3.1.7	Dosage des protéines .....	26
3.2	Protocoles d'analyse .....	26
3.2.1	Glucose .....	26
3.2.2	Glycogène .....	27
3.2.3	Glucagon.....	27
3.2.4	Insuline .....	28
3.2.5	Radio-liaison.....	28
3.2.6	Immunobuvardage .....	29
3.3	Protocoles statistiques.....	30
3.3.1	Métabolites .....	30
3.3.2	Récepteurs au glucagon .....	31
3.3.3	Protéines .....	31
3.3.4	Analyse statistique .....	31
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS.....		32
4.1	Masses et nourriture ingérée.....	32
4.2	Glucose plasmatique et glycogène hépatique .....	33
4.3	Glucagon et insuline plasmatiques .....	34
4.4	Récepteurs au glucagon membranaires.....	36
4.5	Analyse des protéines par immunobuvardage .....	36
4.5.1	Récepteurs au glucagon .....	36
4.5.2	Protéines de signalisation du RG .....	38
4.5.3	Protéines de désensibilisation .....	41

CHAPITRE V	
RÉSULTATS ANNEXÉS DE LA CINÉTIQUE D'EXERCICE.....	47
5.1 Glucose plasmatique et glycogène hépatique .....	48
5.2 Glucagon et insuline plasmatiques .....	48
5.3 Récepteurs au glucagon membranaires.....	50
CHAPITRE VI	
DISCUSSION .....	51
6.1 Techniques utilisées.....	51
6.2 Cinétique d'exercice et de récupération post-exercice .....	53
6.3 Cinétique de jeûne et de récupération post-jeûne .....	59
6.4 Résumé des implications et mécanismes probables .....	62
6.4.1 Exercice .....	62
6.4.2 Jeûne .....	64
6.5 Comparaison des résultats d'exercice et de jeûne .....	65
6.6 Perspectives de recherche .....	66
6.7 Conclusion .....	67
BIBLIOGRAPHIE.....	69

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Niveau des réserves glucidiques après un exercice intense chez un sujet sain (adaptée de Wasserman, 2009) .....	2
1.2 Représentation biochimique des voies des enzymes impliquées dans la régulation du glucose hépatique (adaptée de Moller, 2001) .....	3
1.3 Schéma de la régulation du métabolisme glucidique.....	5
1.4 Localisation du récepteur au glucagon via sa liaison à une cible à affinité normale ou forte (adaptée de Authier and Desbuquois, 2008). .....	7
1.5 Mécanisme d'activation de la signalisation du récepteur au glucagon (adaptée de Marlen et al. 1992).....	8
1.6 Courbe de saturation des récepteurs hépatiques au glucagon (Melançon 2005) .....	10
1.7 Régulation moléculaire de l'activité de l'AMPK .....	12
1.8 Cascade de signalisation de l'AMPK (Cells Signaling Technology, Danver, MA, USA).....	14
1.9 Mécanisme de désensibilisation des RCPG par les GRK et l'arrestine (Dzimiri 1999).....	19
3.1 Description des groupes d'exercice et de récupération post-exercice .....	23
3.2 Description des groupes de jeûne et de récupération post-jeûne .....	24
3.3 Figure descriptive des lobes hépatiques (adaptée de Aller, Arias et al. 2008) .....	25

4.1	Variation du ratio glucagon/insuline au jeûne .....	35
4.2	Densité des RG sur les membranes plasmiques des hépatocytes au jeûne (pmol/mg de protéines).....	36
4.3	Quantité relative des RG totaux à l'exercice (exprimée en valeur arbitraire). ....	37
4.4	Quantité relative de l'AMPK (exprimée en valeur arbitraire).....	40
4.5	Quantité relative de la LKB1 (exprimée en valeur arbitraire) .....	41
4.6	Quantité relative de la PKC (exprimée en valeur arbitraire) .....	44
4.7	Quantité relative de la GRK (exprimée en valeur arbitraire).....	45
4.8	Quantité relative de la $\beta$ -arrestine (exprimée en valeur arbitraire). ....	46
5.1	Variation du ratio glucagon/insuline à l'exercice .....	49
5.2	Densité des RG sur les membranes plasmiques des hépatocytes (pmol/mg de protéines) .....	50
6.1	Quantité relative en ARNm codant pour le RG hépatique (expression en % de GluR/ $\beta$ -actin) (adaptée de Melançon, Gagnon et al. 2011) .....	55
6.2	Quantité relative en AMPK en fonction de la densité en RG membranaires .....	57
6.3	Quantité relative en GRK en fonction de la densité en RG membranaires .....	58
6.4	Concentration en lactate plasmatique au jeûne (valeur arbitraire sur le contrôle)....	61
6.5	Représentation schématique de l'effet de l'exercice sur le RG .....	63
6.6	Représentation schématique de l'effet du jeûne sur le RG .....	65

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Cibles préférentielles du complexe LKB1/STRAD/MO25 .....	16
3.1 Anticorps primaires .....	30
4.1 Rappel des temps d'exercice, de repos post-exercice, de jeûne et de réplétion post-jeûne pour chacun des groupes .....	32
4.2 Variation de masse des animaux au jeûne face au groupe contrôle (en grammes)...	33
4.3 Concentration plasmatique de glucose au jeûne (mmol/L).....	33
4.4 Concentration hépatique en glycogène chez les animaux au jeûne ( $\mu$ mol unités glycosyl/kg de foie sec) .....	34
4.5 Concentration plasmatique de glucagon au jeûne (pmol/L) .....	35
4.6 Concentration plasmatique d'insuline au jeûne (pmol/L).....	35
4.7 Quantité relative des RG totaux à l'exercice .....	37
4.8 Quantité relative des protéines de signalisation à l'exercice .....	38
4.9 Quantité relative des protéines de signalisation au jeûne .....	39
4.10 Quantité relative des protéines de désensibilisation à l'exercice.....	42
4.11 Quantité relative des protéines de désensibilisation au jeûne.....	43

5.1	Rappel des temps d'exercice et de repos post-exercice pour chacun des groupes ...	47
5.2	Concentration plasmatique de glucose à l'exercice (mmol/L) .....	48
5.3	Concentration hépatique en glycogène chez les animaux à l'exercice ( $\mu$ mol unités glycosyl/kg de foie sec).....	48
5.4	Concentration plasmatique de glucagon à l'exercice (mmol/L) .....	48
5.5	Concentration plasmatique d'insuline à l'exercice (pmol/L).....	49

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGL	Acides gras libres
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside
AMPc	Adénine mono-phosphate
AMPK	Adénine mono-phosphate kinase
AMPKk	AMPK kinase
ATP	Adénine triphosphate
Bmax	Liaison maximum (binding maximum)
CaMk	Protéine kinase dépendante à la calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$
CaMkk	CaMk kinase
GLP-1	Glucagon-like-protein 1
GLP-2	Glucagon-like-protein 2
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
GRK	Protéine kinase liée aux protéines G
IP3	Inositol 1-4-5 triphosphate
LKB1	Sérine/Thréonine kinase 11
PEPck	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PHG	Production hépatique de glucose
RG	Récepteur au glucagon
RHG	Récepteur hépatique au glucagon
TAK1	Kinase active par le facteur de croissance $\beta$

## RÉSUMÉ

Les travaux de Melançon (Melançon 2005) ont montré que le récepteur au glucagon (RG) peut être modulé rapidement par 180 minutes d'exercice ou 24 heures de jeûne. Cette modulation provient en partie de la hausse de la densité des récepteurs au glucagon membranaire. Plus récemment, les travaux de Merlen (Merlen, Fabrega et al., 2006) ont montré l'endocytose du récepteur au glucagon suite à un bolus de glucagon. Le présent projet vise à établir une cinétique de protéines reliées à la signalisation et à l'internalisation du RG. Spécifiquement, nous avons effectué une cinétique sur 24 heures suivant un exercice intense et un jeûne prolongé pour analyser par immunobuvardage l'AMPK, la LKB1, la GRK, la PKC et la  $\beta$ -arrestine.

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été aléatoirement assignés à des groupes contrôle, d'exercice (90 min et 180 min d'exercice, 180 min +1 h, +3 h, +12 h et +24 h de récupération au repos post-exercice) ou de jeûne (6 h, 12 h et 24 h de jeûne, 24 h jeûne + 6 h, + 12 h et + 24 h de récupération nourrie post-jeûne). Aucun changement statistiquement significatif n'est observé au niveau de la glycémie. Cependant, les niveaux de glycogène hépatique sont grandement diminués dans les deux cas, 98 % de déplétion après 24 heures de jeûne et 74 % après 3 heures d'exercice en comparaison à leur groupe contrôle respectif.

Une période d'exercice induit, chez des rats sains, une augmentation significative de 244 % des récepteurs membranaires au glucagon alors qu'il n'y a aucune variation significative de l'expression des récepteurs totaux. Ces données permettent de formuler l'hypothèse d'un mécanisme de sensibilisation/désensibilisation des récepteurs au glucagon expliquant cette grande mobilité lors de l'exercice. Le mécanisme de sensibilisation apparaît en même temps qu'une augmentation des quantités d'AMPK et de GRK de l'ordre de 183 et 158 % respectivement. Le mécanisme de désensibilisation en récupération s'opère simultanément avec une augmentation de l'expression de PKC de 207 % et une diminution d'AMPK de l'ordre de 60 %.

Une période de jeûne prolongé induit chez des rats sains une augmentation significative de 165 % des récepteurs membranaires au glucagon. Cette augmentation n'est accompagnée d'aucun changement significatif dans l'expression des protéines étudiées ouvrant la voie à la synthèse de l'ARNm pour contribuer à l'augmentation des RG membranaires lors du jeûne.

Mots clés : Récepteur au glucagon, AMPK, LKB1, GRK, PKC,  $\beta$ -arrestine, jeûne, exercice



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

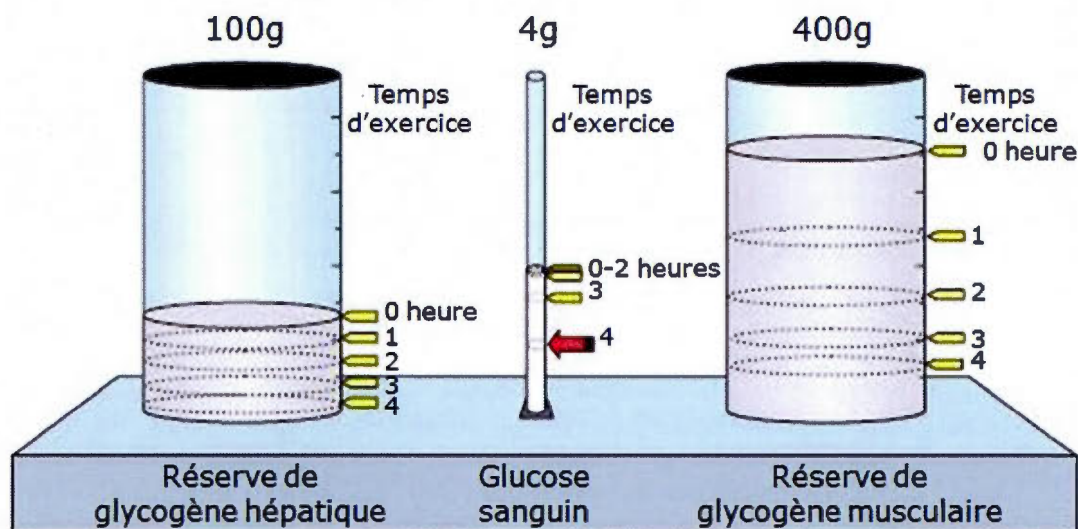
#### 1.1 Métabolisme glucidique

Le glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) est la principale source d'énergie de l'organisme. Chez l'homme, une concentration de quatre grammes doit être continuellement présente en circulation dans le sang (Wasserman 2009) pour assurer le bon fonctionnement du corps et principalement du cerveau qui consomme à lui seul 60 % du glucose sanguin chez un sujet sain et au repos. Ce besoin en glucose s'explique par le fait que la glycolyse (dégradation du glucose en pyruvate) est le phénomène cellulaire permettant l'apport d'ATP le plus efficace, tant en quantité qu'en efficacité, lorsqu'elle est jumelée au cycle de Krebs et à la chaîne de transport des électrons (Lodish, Berk et al. 2005). Le métabolisme des lipides est théoriquement plus énergétique (9,4 kcal/g de lipides) que celui des glucides (4,1 kcal/g de glucides), mais son utilisation est beaucoup plus limitée et beaucoup plus exigeante en oxygène dans le processus (5,6 mol d'ATP/ $O_2$  pour les lipides contre 6,3 mol d'ATP/ $O_2$  pour les glucides) ce qui en fait une cible de second choix lorsque vient le temps d'utiliser ces réserves (Wilmore 2008). De plus, la lipolyse est strictement oxygène dépendante, ce qui implique l'utilisation des glucides lors de conditions anaérobiques.

##### 1.1.1 Réserves glucidiques

Le glucose provient de notre alimentation qui se compose normalement de 55-60 % de glucides, 30 % de lipides, dont moins de 10 % saturés et 10 -15 % de protéines (Wilmore

2008). Le glucose est stocké sous forme de glycogène principalement dans le foie et les muscles squelettiques (environ 80 % dans les muscles et 18 % dans le foie) le reste étant libre dans la circulation des fluides organiques. Les réserves de glycogène participent à maintenir l'homéostasie glucidique, et ce, malgré un exercice intense (Figure 1.1).

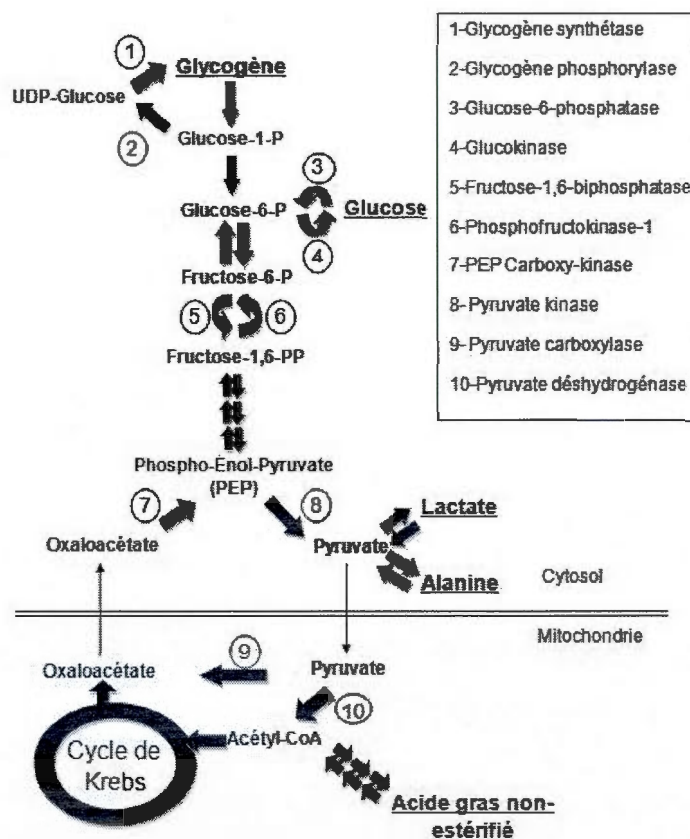


**Figure 1.1** Niveau des réserves glucidiques après un exercice intense chez un sujet sain (adaptée de Wasserman, 2009).

Le glycogène, élément physiologique introduit au milieu du 19<sup>ème</sup> siècle par Bernard (Bernard 1857), est un polysaccharide avec une structure complexe et dont les nombreuses ramifications permettent une utilisation rapide et facile de l'énergie stockée. Le glycogène représente entre 1 à 2 % de la masse musculaire et 6 à 10 % de celle du foie (Prevost 1999), ces deux tissus permettent d'en stocker environ 500 g. Le glycogène musculaire n'est pas accessible aux autres tissus puisque l'enzyme glucose 6-phosphatase n'est pas exprimée dans le muscle squelettique. Seul le glycogène hépatique est utilisable pour les besoins glucidiques de l'organisme.

Le glycogène hépatique peut être catabolisé de nouveau en glucose afin de répondre aux besoins d'une utilisation accrue ou d'une baisse de la glycémie. Ce phénomène, la glycogénolyse, est l'atout majeur du foie pour la production de glucose. En effet, la production hépatique de glucose (PHG) repose majoritairement durant un exercice intense sur les réserves préalablement emmagasinées dans le foie (Ahlborg and Felig 1982; Wasserman 1995).

Dès que les réserves de glycogène commencent à s'épuiser, les hépatocytes enclenchent la néoglucogénèse pour la production de glucose (Warhen 1971; Landau, Wahren et al. 1996). La néoglucogénèse permet de transformer des précurseurs non-glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol et des acides aminés glucoformateurs dont l'alanine (Figure 1.2) (Wilmore 2008).



**Figure 1.2** Représentation biochimique des voies des enzymes impliquées dans la régulation du glucose hépatique (adaptée de Moller, 2001).

## 1.2 Hormones responsables de la régulation glucidique

Dans son ensemble, la régulation glucidique se fait par deux hormones pancréatiques qui sont l'insuline et le glucagon. Bien qu'une certaine forme d'autorégulation identifiée en 1938 par Soskin existe (Soskin, Essex et al. 1938), l'activation et l'inactivation des voies de régulation dépendent principalement de ces deux hormones pancréatiques (Moore, Cherrington et al. 2003) (Figure 1.3).

### 1.2.1 Insuline

L'insuline, l'hormone anabolique la plus influente et la seule hormone hypoglycémisante du corps (Cheng, Dube et al. 2002), est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie. Suite à une hyperglycémie, l'insuline se lie à son récepteur de type tyrosine kinase, principalement situé sur les membranes des cellules musculaires, hépatiques et adipocytaires (Marks, Marks et al. 1996). Dans le muscle et les tissus adipeux, cette liaison favorise l'activation des transporteurs GLUT-1 et la translocation des transporteurs du glucose GLUT-4 vers les membranes ce qui favorise le transport actif du glucose vers le cytoplasme. Le récepteur provoque, via une multitude de kinases, la diminution de seconds messagers dont principalement l'AMPc et le  $Ca^{2+}$  ce qui provoque l'activation de la glycogénèse (déphosphorylation de la glycogène synthétase) et de la lipogénèse (stimulation de l'acétyl CoA carboxylase) ainsi que l'inhibition de glycogénolyse (glycogène phosphorylase), de la néoglucogénèse (via la phosphoénolpyruvate carboxykinase) et de la lipolyse (inhibition de la lipase hormono sensible).

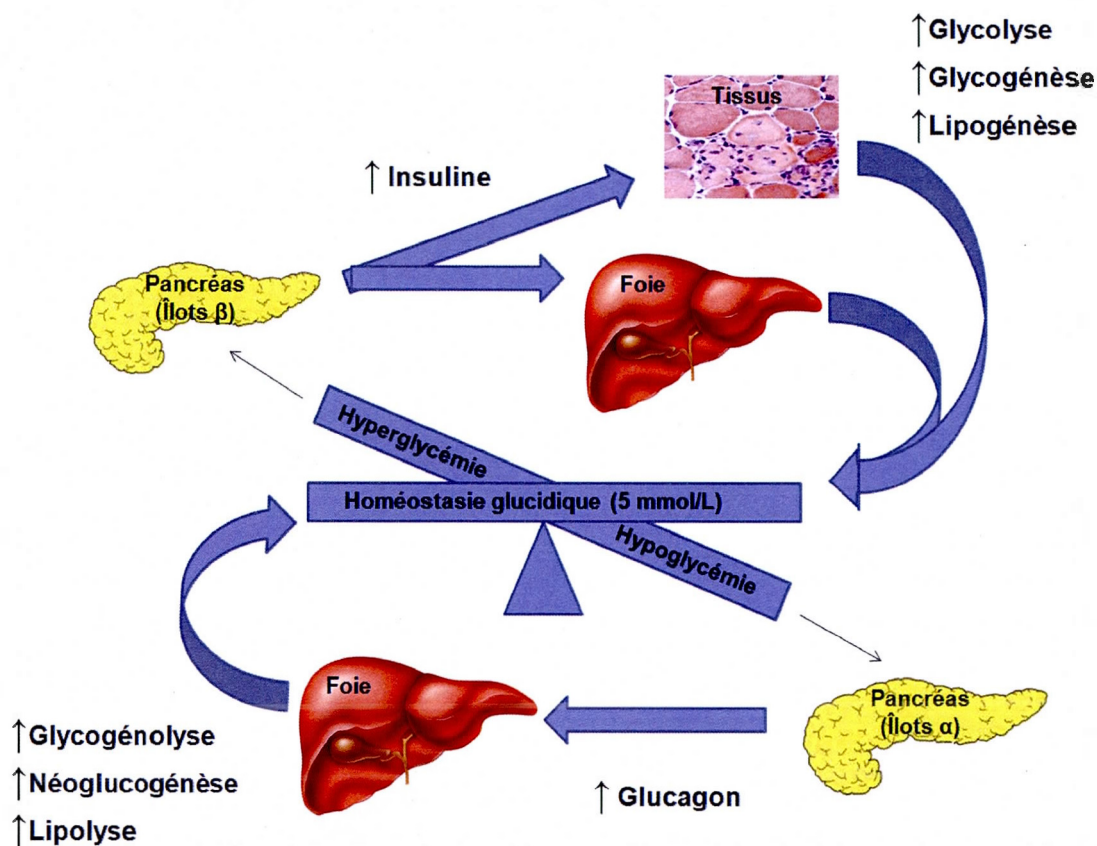
### 1.2.2 Glucagon

En réponse à une baisse de la glycémie, les cellules alpha des îlots de Langerhans expriment et libèrent le glucagon (Bell, Sanchez-Pescador et al. 1983; Holst 2007). Il est synthétisé à partir de proglucagon, protéine de 160 acides aminés, qui est clivé pour donner



différentes hormones dont principalement le glucagon (pancréas), le glucagon-like-peptide GLP-1 et le GLP-2(intestin) (Authier and Desbuquois 2008).

Le rôle majeur du glucagon est d'induire la production hépatique de glucose (PHG) via une stimulation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse. L'effet du glucagon est donc de contre-réguler l'insuline et son effet est parmi les plus puissantes contre-régulations du système hormonal (Cryer 2008).

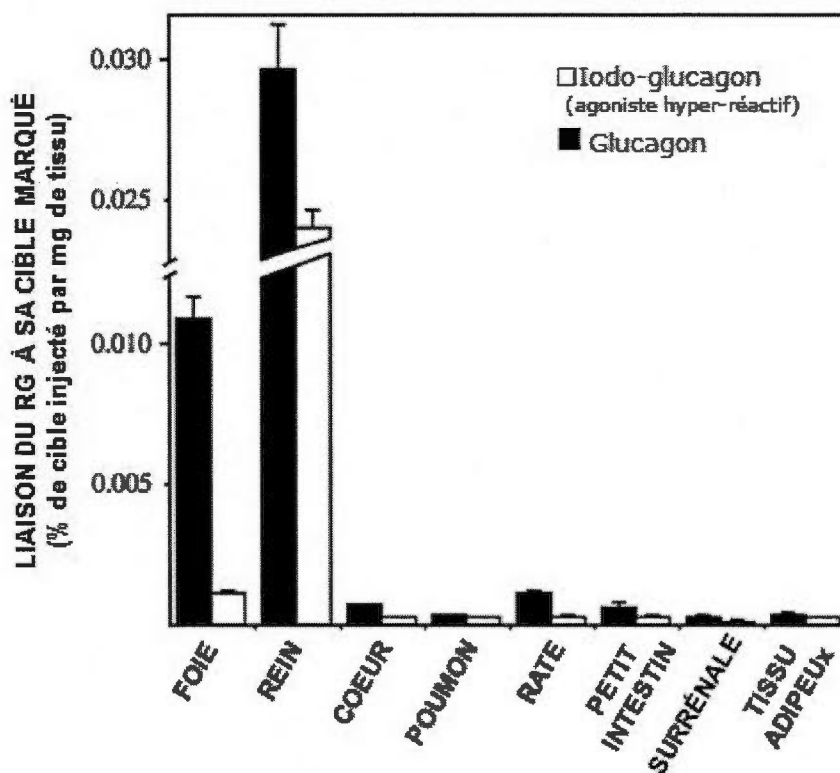


**Figure 1.3** Schéma de la régulation du métabolisme glucidique.

### 1.3 Récepteur au glucagon

L'action du glucagon sur la régulation glucidique résulte de sa liaison à son récepteur spécifique. Le récepteur au glucagon (RG) a été initialement décrit en 1971 par Rodbell (Rodbell, Krans et al. 1971) comme une entité de la membrane plasmique hépatique capable de lier le glucagon et est relié à l'adénylate cyclase et à la phospholipase C. Le RG appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En effet, le RG est un RCPG à sept domaines transmembranaires de classe B3, soit un récepteur à longue chaîne C-terminale intracellulaire liant un complexe de protéines G (Iyengar, Herberg et al. 1984; Combarnous 2004). La sous-classe B est caractérisée par la présence de ponts disulfures reliant les boucles du domaine extracellulaire N-terminal (Mayo, Miller et al. 2003). Le RG transmet ses signaux intracellulaires via deux seconds messagers soit : l'AMP 3'-5'-cyclique et l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), la production de ces deux seconds messagers se déroulant par l'entremise de cibles distinctes de la protéine G, l'adénylate cyclase et la phospholipase C (Jelinek, Lok et al. 1993; Christophe 1995).

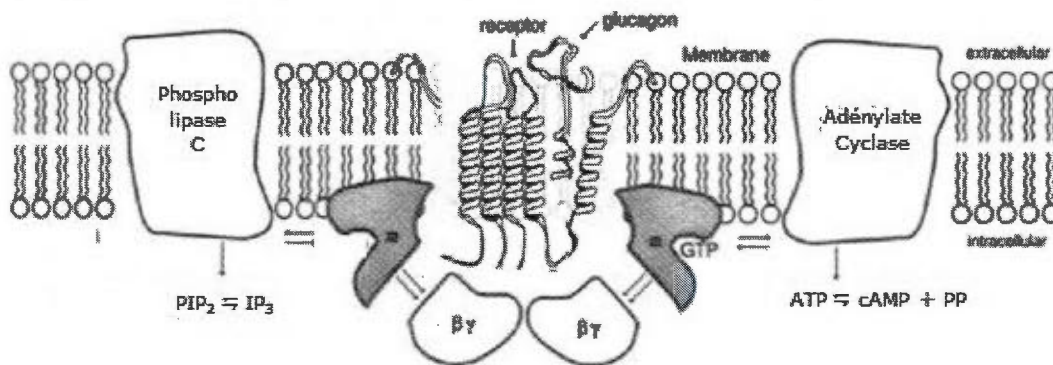
Le RG a été identifié *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs tissus. Principalement retrouvé dans le foie et les reins (qui possède aussi une fonction néoglucoformatrice, mais à un niveau plus faible que celle du foie (Gerich 2010)), le RG est aussi exprimé en moindre quantité dans le cœur, le tissu adipeux, la rate, les glandes surrénales, le pancréas et le cortex cérébral (Figure 1.4). Dans le foie, le RG est localisé en grande partie dans les hépatocytes bien qu'il ait aussi été identifié dans les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer (Watanabe, Kanai et al. 1988).



**Figure 1.4** Localisation du récepteur au glucagon via sa liaison à une cible à affinité normale ou forte (adaptée de Authier and Desbuquois, 2008).

L'action du récepteur au glucagon, comme tout autre RCPG dépend d'une série de réactions croisées afin d'établir une cascade signalétique menant à son action. Le glucagon se lie à son récepteur via le domaine extracellulaire N-terminal, ce qui permet au complexe formé d'interagir avec les boucles e1 et e3 de la chaîne membranaire (Combarrous 2004). Le changement de conformation des chaînes membranaires induit par la liaison provoque une interaction avec la protéine G composée des sous-unités alpha, bêta et gamma. Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont pratiquement toujours les mêmes, tandis que différentes classes de sous-unités  $\alpha$  permettront la liaison à un effecteur spécifique (Pierce, Premont et al. 2002). L'interaction ligand/récepteur provoque la dissociation d'un GDP sur la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  et la liaison d'une molécule de GTP, cet échange provoque la dissociation de la sous-unité  $G_{\alpha}$ . Pour pouvoir se réassocier au complexe, la sous-unité  $G_{\alpha}$  transfère un groupement phosphate du GTP vers l'adénylate cyclase (AC) ce qui a pour effet de l'activer. C'est la cyclisation

d'ATP par l'AC, causant un changement du ratio AMP/ATP, qui provoque la cascade de signalisation du glucagon (Figure 1.5). La protéine G peut aussi activer une autre protéine membranaire, la phospholipase C de type  $\beta$  (Hansen, Gromada et al. 1998). L'activation de la phospholipase  $C_\beta$  provoque une augmentation intracellulaire d'IP<sub>3</sub>. La fixation d'IP<sub>3</sub> sur ses récepteurs sur le réticulum endoplasmique (RE) induit l'activation des canaux calciques des citernes du RE, provoquant la sortie du calcium et une augmentation de la concentration cytosolique des ions  $Ca^{2+}$ . Ce signal calcique entraîne l'activation de diverses protéines dépendantes du calcium impliquées dans la régulation des réserves énergétiques telles que les différentes calmodulines kinases (CaMk) ou la protéine kinase C (PKC).



**Figure 1.5** Mécanismes d'activation de la signalisation du récepteur au glucagon (adaptée de Marlen et al. 1992).

### 1.3.1 Récepteur au glucagon lors du jeûne et de l'exercice

L'exercice et le jeûne sont tous deux des conditions nécessitant un ajustement précis entre la production hépatique de glucose et l'utilisation périphérique de glucose afin de maintenir la glycémie dans les valeurs normales. Ces deux conditions physiologiques sont caractérisées par une baisse de l'insulinémie et par une augmentation de la glucagonémie.

L'importance du rôle du glucagon au jeûne et à l'exercice provient autant d'études chez l'homme que chez l'animal (Alford, Bloom et al. 1974; Moore, Connolly et al. 1998; Bonjorn, Latour et al. 2002; Drouin, Robert et al. 2004). Une étude a montré le rôle du



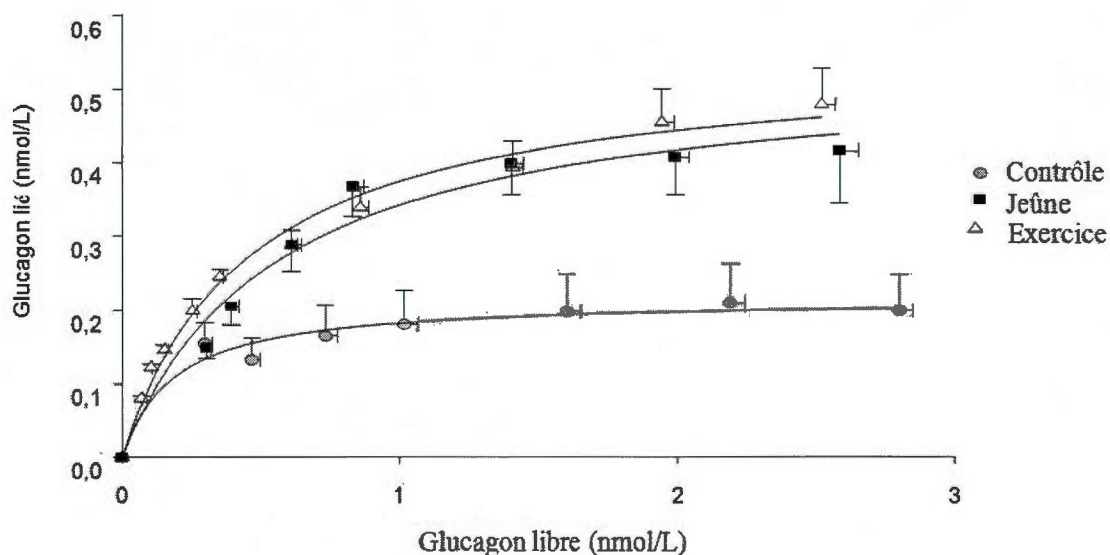
glucagon dans l'augmentation significative de la PHG et de la néoglucogenèse pendant une période d'exercice de deux heures (Lavoie, Ducros et al. 1997). D'autres études ont montré qu'une période prolongée d'exercice induit une augmentation du ratio glucagon/insuline accompagnée d'une hausse de l'exposition du récepteur à son ligand lors de l'exercice (Wasserman, Spalding et al. 1989; Lavoie, Ducros et al. 1997; Hoene, Lehmann et al. 2009).

Le jeûne s'accompagne d'une déplétion importante des réserves de glycogène hépatique, déplétion qui varie selon la durée du jeûne (Melançon 2005). Toutefois, même en dépit de cette déplétion des réserves de glycogène hépatique, la glycémie demeure relativement constante (Barzilai, Massillon et al. 1995). Des données récentes de notre équipe ont montré qu'un jeûne de 24 h s'accompagne d'une déplétion de près de 86 % des réserves de glycogène et ce, tout en maintenant la glycémie dans les valeurs normales (Melançon 2005). La stimulation du glucagon sur les cellules hépatiques, par ses effets sur la glycogénolyse et la néoglucogenèse, permet donc de maintenir une normoglycémie lors du jeûne.

Il existe plusieurs études *in vitro* sur les propriétés de liaison des RG (Buggy, Heurich et al. 1997; Krilov, Nguyen et al. 2008), mais peu *in vivo* (Authier, Desbuquois et al. 1992; Merlen, Fabrega et al. 2006) et encore moins dans des situations physiologiques caractérisées par une augmentation de la densité des RG. Notre laboratoire s'intéresse aux capacités d'adaptation du foie, principalement celle du RG, lors du jeûne et de l'exercice. Dans une première étude en 2001, Légaré (Légaré, Drouin et al. 2001) a montré que l'exercice chronique pendant huit semaines s'accompagnait d'une hausse de 28 % de la densité des RG membranaire et que ceci pouvait expliquer l'augmentation de la sensibilité au glucagon induit par l'entraînement.

En situation aiguë, Melançon et al. (Melançon 2005) ont mesuré la densité des RG sur les membranes plasmiques des cellules hépatiques lors d'une période de jeûne de 24 heures et lors d'une période d'exercice de trois heures. Utilisant la même technique de radioliation adaptée de Frandsen par Légaré et al (Frandsen, Thim et al. 1985; Légaré, Drouin et al. 2001), Melançon et al. ont montré une augmentation de la densité membranaire des RG de 159 % et 165 % lors d'une période de jeûne et d'exercice respectivement (Figure 1.6). Cette

augmentation de la densité s'accompagnait d'une baisse de l'affinité dans le jeûne et du maintien de l'affinité dans l'exercice.



**Figure 1.6** Courbes de saturation des récepteurs hépatiques au glucagon (Melançon 2005).

#### 1.4 Protéines impliquées dans la gestion du métabolisme glucidique

Le mécanisme d'action du glucagon, la réponse induite, la sensibilisation et la désensibilisation des hépatocytes au glucagon dépendent d'une kyrielle de protéines post-récepteur. L'objectif de ce travail de maîtrise est de décrire l'implication de cinq protéines, la PKC, le GRK, l'AMPK, la LKB1 et la  $\beta$ -arrestine, impliquées dans la cascade signalétique du RG ou dans la mobilité induite par la sensibilisation et la désensibilisation.

##### 1.4.1 AMPK

La protéine kinase activée par l'AMP (traduction libre de *AMP-activated protein kinase*), désignée par l'acronyme AMPK est une sérine/thréonine kinase agissant comme senseur principal du niveau d'énergie cellulaire. Lorsque les réserves cellulaires en ATP

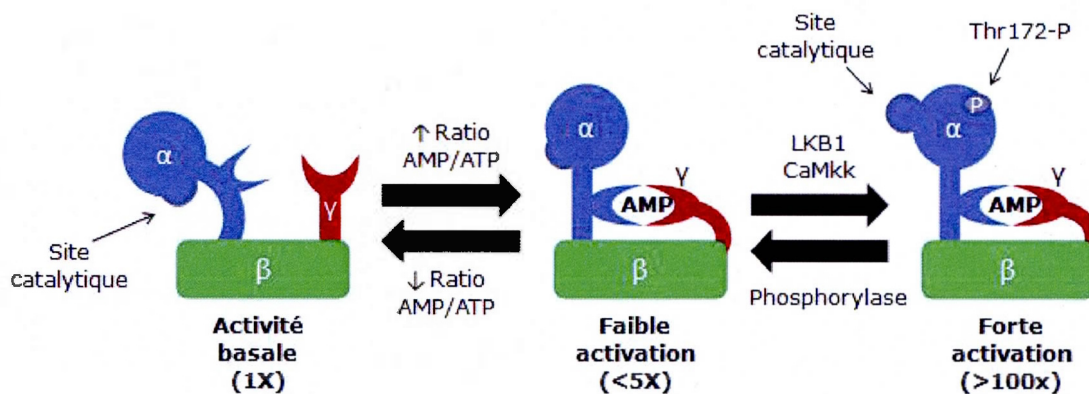
diminuent, par la baisse du niveau de glucose oxydable ou par la transformation d'ATP en AMPc via l'adénylate cyclase, l'AMPK est l'élément déclencheur d'une série de réactions visant à rétablir le niveau d'ATP intracellulaire. Pour ce faire, l'AMPK enclenche une série de réactions cataboliques (producteur d'ATP) et inhibe certaines réactions anaboliques (utilisant l'ATP).

L'AMPK est une protéine hétérotrimérique constituée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Chaque sous-unité est codée par différents gènes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) et chaque ARNm présente des possibilités d'épissage alternatif permettant une multitude de possibilités (Hardie and Sakamoto 2006). La protéine AMPK  $\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$  est la plus répandue dans l'ensemble des tissus et s'avère très conservée dans l'évolution, se retrouvant autant dans le génome des protozoaires que des grands mammifères (Hardie, Scott et al. 2003). La sous-unité catalytique  $\alpha$  contient le site de phosphorylation, une thréonine située en position 172, nécessaire à sa pleine activation. L'activité de l'AMPK est environ 100 fois plus grande suivant sa phosphorylation (Jensen, Wojtaszewski et al. 2009). La sous-unité  $\beta$  agit comme protéine de repliement afin de maintenir ensemble les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . De plus, la sous-unité  $\beta$  contient un domaine de liaison au glycogène dont la fonction reste encore à élucider (Polekhina, Gupta et al. 2003). La sous-unité  $\gamma$  agit comme structure d'activation passive. Des sites de liaison de l'ATP et de l'AMP interchangeable permettent de détecter le changement du ratio AMP/ATP. L'augmentation du ratio AMP/ATP provoque une légère activation de l'activité catalytique de la sous-unité  $\alpha$  puisque la liaison de l'AMP au complexe AMPK provoque un changement de conformation avantageant l'activité catalytique (Corton, Gillespie et al. 1994) (Figure 1.7).

L'activation de l'AMPK dépend d'autres kinases (AMPKk) qui en phosphorylant la thréonine 172, changent la conformation de l'hétérotrimère et exposent le site catalytique de la sous-unité  $\alpha$ . Dans les cellules musculaires et hépatiques, la LKB1 est l'AMPKk la plus importante. Cependant, puisque l'activation de la LKB1 dépend, en partie, de l'augmentation du ratio AMP/ATP et que l'AMPK subit simultanément une activation passive par l'AMP, les autres AMPKk doivent pouvoir agir indépendamment de la modification du ratio AMP/ATP.

C'est le cas de la CaMkk dont le facteur d'activation est une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , qui accompagne habituellement une hausse de la demande en ATP principalement dans le muscle en raison de l'induction de la contraction musculaire (Hardie and Sakamoto 2006). L'AMPK peut aussi être activée par la TAK1, une AMPKk nouvellement identifiée, mais dont le mécanisme d'action tarde encore à être précisé (Momcilovic, Hong et al. 2006).

La désactivation de l'AMPK se fait de deux façons : 1) passivement via la désactivation des AMPKk ou 2) activement via une déphosphorylation. La désactivation passive peut survenir par exemple via le retour à la normale du ratio AMP/ATP dans le cas de la LKB1 (Sanz 2008). L'insuline est un parfait exemple d'inactivation active : son action sur l'AKT provoque la phosphorylation de la sérine 485 de la sous-unité  $\alpha 1$ , bloquant l'action des AMPKk (Horman, Vertommen et al. 2006).



**Figure 1.7** Régulation moléculaire de l'activité de l'AMPK.

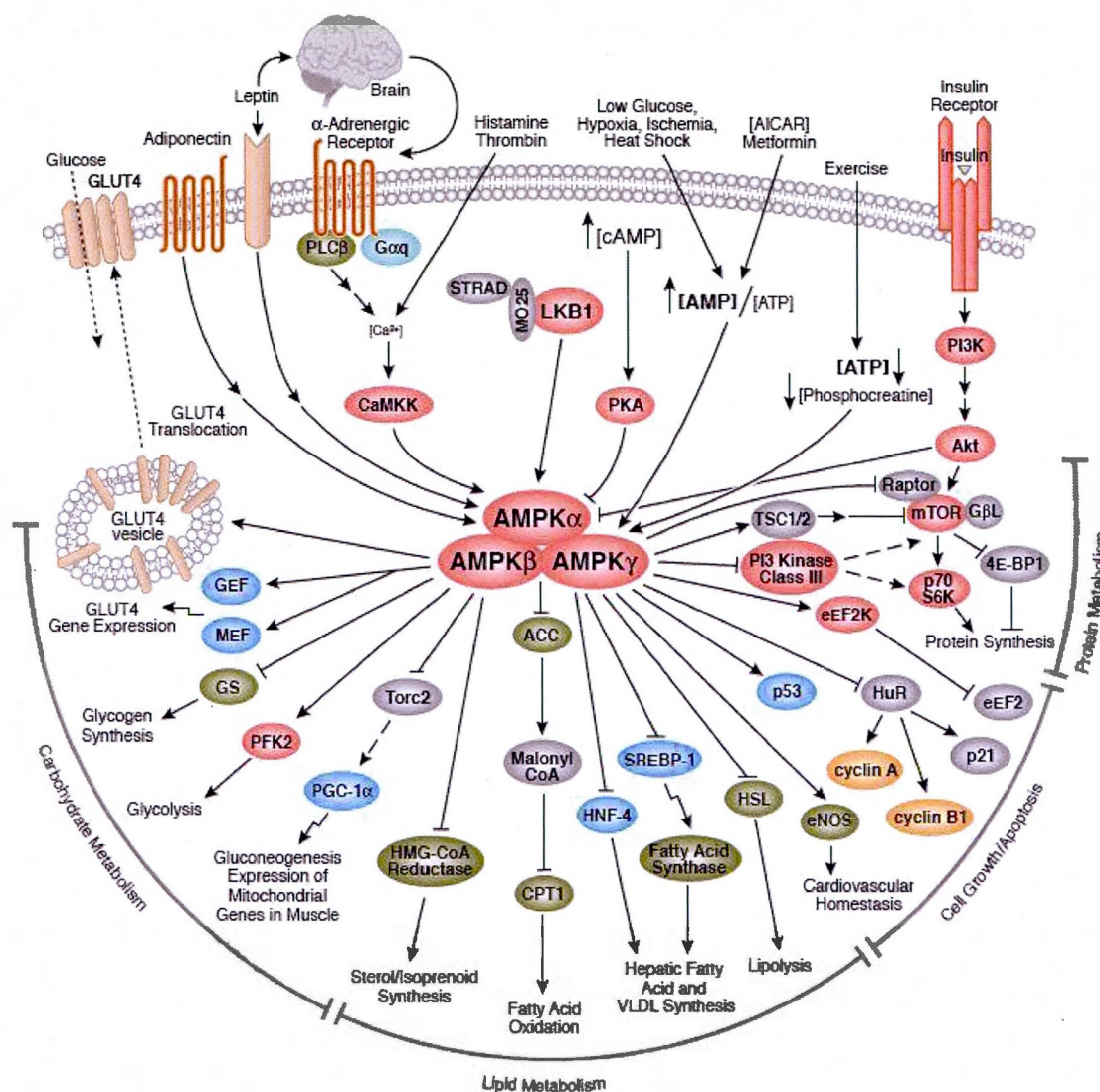
Les cibles et les effets de l'AMPK sont multiples (Figure 1.8), je ne m'attarderai ici qu'aux effets sur le métabolisme des glucides.

Le métabolisme du glucose dans les cellules hépatiques est aussi très influencé par l'AMPK. L'injection d'AICAR, un puissant activateur chimique de l'AMPK induit un effet hypoglycémique via une baisse de la PHG (Fujii, Jessen et al. 2006; Fujii, Keene et al. 2006).

Des évidences récentes permettent de croire que l'AMPK puisse jouer un rôle central dans la régulation de l'homéostasie glucidique en réponse à l'exercice (Ruderman, Park et al. 2003; Hardie, Hawley et al. 2006). Au niveau hépatique, l'AMPK inhibe la PHG par son effet répresseur sur l'expression de 2 gènes d'enzymes clés de la néoglucogenèse soient la G6Pase et la PEPCK, les mécanismes qui sous-tendent ces observations demeurent toujours imprécis (Viollet, Mounier et al. 2007). Puisque l'activation et l'inactivation de l'AMPK déclenchent des effets métaboliques, il importe d'en préciser l'effet au niveau du foie dans des situations physiologiques telles le jeûne et l'exercice et ceci, en considérant les données contradictoires sur l'AMPK rapportées avec l'exercice (Carlson and Winder 1999; Ruderman, Park et al. 2003; Camacho, Donahue et al. 2006; Hoene, Lehmann et al. 2009). Tel que rapporté par Ruderman (Ruderman, Park et al. 2003), 30 minutes d'exercice ont augmenté les activités des deux isoformes hépatiques  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de l'AMPK (Park, Kaushik et al. 2002). Puisque l'exercice entraîne une réduction des réserves glucidiques hépatiques, en particulier du glycogène, une augmentation du glucagon pourrait amplifier l'AMPK (Longuet, Sinclair et al. 2008; Berglund, Lee-Young et al. 2009). Cette amplification du signal via l'AMPK serait un mécanisme indépendant de la LKB1, mais l'implication de la CaMKK $\beta$  demeure à être validée.

Peu de données sont disponibles sur l'implication de l'AMPK dans la régulation de la PHG, et en particulier lorsqu'il y a des variations de glycogène hépatique durant l'exercice et le jeûne. Pourtant, l'exercice a un effet opposé sur l'activation de l'AMPK et la PHG puisque cette dernière augmente à l'exercice alors que l'activité AMPK diminue. Cette relation inverse pourrait expliquer qu'en situation de réserves de glycogène hépatique diminuées, l'activation du système AMPK pourrait être supprimée à la suite du recrutement plus important de RG membranaires induit par l'exercice. À l'inverse, en situation où les réserves de glycogène hépatique sont renouvelées, le système AMPK serait plus actif et pourrait inhiber la PHG. À notre connaissance, aucune information n'existe sur cette inhibition dans la littérature scientifique.





**Figure 1.8** Cascade de signalisation de l'AMPK (Cells Signaling Technology, Danver, MA, USA).

#### 1.4.2 LKB1

La LKB1 est une sérine/thréonine kinase codée par le gène STK11. Elle a été identifiée en 1999 comme l'un des premiers gènes suppresseurs de tumeur (Ylikorkala, Avizienyte et al. 1999). La LKB1 forme un complexe trimérique avec deux autres protéines de régulation; STRAD, une pseudokinase inactive et MO25, une protéine de type «armadillo repeat

scaffolding-like protein» (Boudeau, Scott et al. 2004). Des études faites en désactivant certaines fonctions des trois protéines mentionnées ci-dessus ont montré que STRAD active la LKB1, alors que MO25 permet aux deux protéines de complexer ensemble et donc d'induire l'activité kinase du complexe LKB1-STRAD-MO25 (Milburn, Boudeau et al. 2004). Structurellement, on observe que la LKB1 se lie au site de pseudokinase de STRAD alors que MO25 se lie à l'extrémité C-terminale de STRAD afin de stabiliser le complexe (Boudeau, Baas et al. 2003). Le trimère LKB1-STRAD-MO25 permet d'ajouter un groupement phosphate sur d'autres protéines kinases dont l'AMPK. Les cibles préférentielles de la LKB1 sont identifiées dans le tableau 1.2. La phosphorylation se fait principalement sur une thréonine située en position 172 et dans une boucle en T sur la sous-unité catalytique de la protéine cible, ici l'AMPK (Katajisto, Vollenius et al. 2007).

La LKB1 est la kinase principale impliquée dans la phosphorylation de l'AMPK hépatique et musculaire. La délétion du gène codant la LKB1 hépatique chez la souris réduit substantiellement la phosphorylation et l'activité de l'AMPK induisant d'importantes hyperglycémies dues à une grande expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Shaw, Lamia et al. 2005). Cette expression se traduirait par une activité prononcée de CREB, normalement inactivée par SIK et TORC2, des cibles du complexe STRAD/MO25/LKB1. Cependant, le rôle de la LKB1, dans le jeûne et l'exercice, demeure peu connu.

**Tableau 1.1**  
Cibles préférentielles du complexe LKB1/STRAD/MO25

<b>Protéines cibles</b>	<b>Fonction</b>	<b>Référence</b>
NUAK	Régulateur de l'apoptose	(Zagorska, Deak et al. 2010)
BRSK	Organisation des microtubules neuronaux	(Bright, Carling et al. 2008)
MARK	Organisation des microtubules épithéliaux	(Kojima, Miyoshi et al. 2007)
Voie du VEGF	Angiogenèse	(Ylikorkala, Rossi et al. 2001)
SIK	Régulation génique de la néoglucogenèse	(Katoh, Takemori et al. 2006)
AMPK	Régulation des mécanismes énergétiques	(Sanz 2008)

#### 1.4.3 Protéines de désensibilisation du récepteur au glucagon

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ne sont pas des récepteurs fixes sur la paroi cellulaire et leurs activités dépendent d'une série de mécanismes de sensibilisation/désensibilisation. L'internalisation du RCPG est considérée comme le mécanisme de «feedback» le plus efficace pour désensibiliser le récepteur de son ligand. Trois familles de protéines provoquent la désensibilisation des RCPG : les arrestines, les kinases de récepteur couplées aux protéines G et les kinases dépendantes d'un second messenger (Ferguson and Caron 1998; Krupnick and Benovic 1998). Biochimiquement, le terme désensibilisation correspond à deux mécanismes : 1) au découplage du couple RCPG/protéine G en laissant les deux protéines sur la membrane ou 2) à l'internalisation du récepteur ce qui empêche sa liaison au ligand (Ferguson 2001). Dans cette section, le terme « désensibilisation » sera utilisé en référence au second mécanisme.

La phosphorylation du RCPG se fait par deux kinases différentes, la PKC et la GRK qui induisent une désensibilisation du récepteur par stabilisation du complexe RCPG /arrestine et recrutement de clathrine (Diviani, Lattion et al. 1997).



#### 1.4.3.1 GRK

La GRK ou protéine kinase de récepteur couplée aux protéines G (traduction libre de G protein-coupled receptor kinases) est une famille de kinases contenant sept différents isomères partageant toutes la même fonction phosphorylante mais agissant sur des cibles protéiques différentes (Premont, Inglese et al. 1995). Néanmoins, leurs cibles sont toutes des résidus sérine ou thréonine situés sur le domaine C-terminal ou sur la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire de la protéine cible. La phosphorylation n'est pas attribuée à un résidu particulier sur le récepteur, mais à une zone définie par le type de GRK. De plus, les études ont montré que les sites de phosphorylation obtenus *in vitro* différaient de ceux obtenus *in vivo* et ce, pour tous les types de GRK (Oakley, Laporte et al. 1999; Premont and Gainetdinov 2007). La phosphorylation du récepteur est dépendante de la liaison du RCPG avec son ligand; la dissociation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$  de la protéine G permet une modification de la structure suffisante à l'exposition des sites de phosphorylation par la GRK. La phosphorylation du RCPG sur les résidus thréonine/sérine des queues carboxy-terminales des récepteurs permet de réguler la stabilité du complexe récepteur/arrestine afin d'effectuer l'internalisation du RCPG (Figure 1.9).

#### 1.4.3.2 PKC

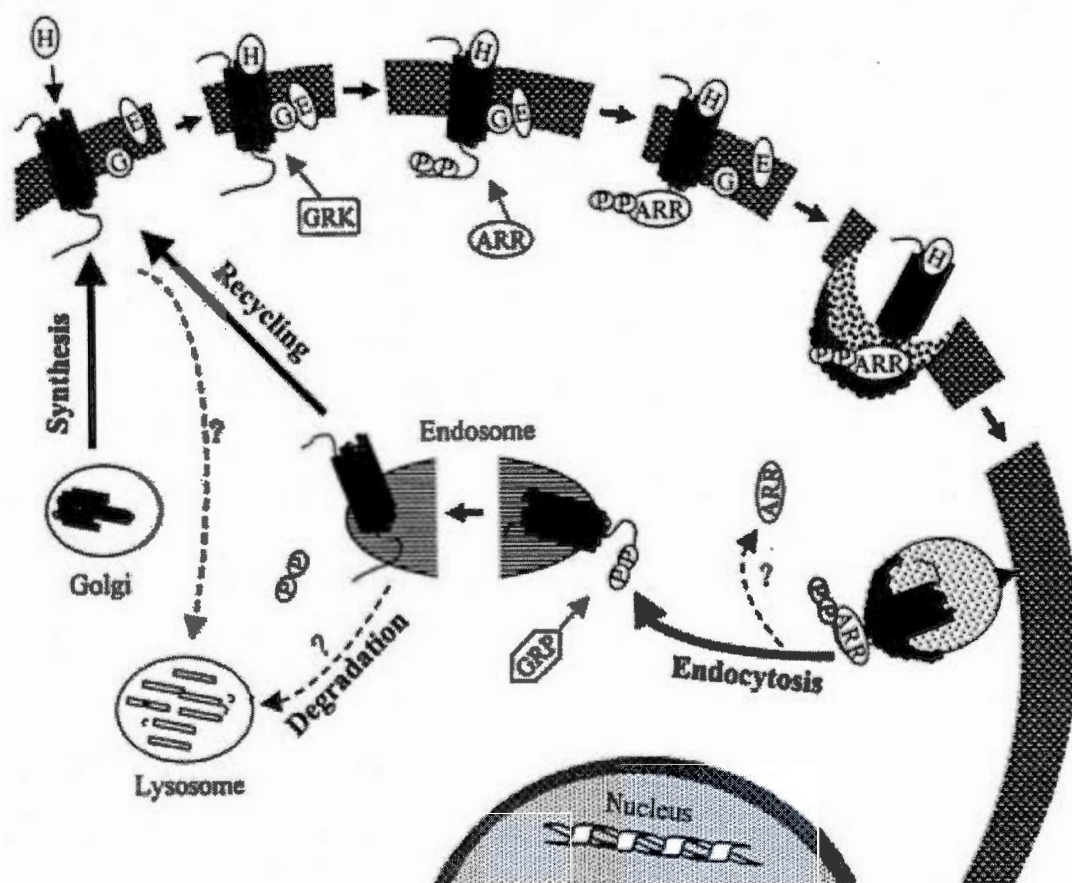
Contrairement à la protéine de type GRK qui est dépendante de la liaison du RCPG avec son ligand pour la phosphorylation, les protéines kinases dépendantes d'un second messenger, telles que la PKC ou la PKA, sont des phospho-transférases qui agissent de façon constitutive. En plus d'une action constitutive, la PKC est aussi influencée par le deuxième second messenger du récepteur au glucagon. En effet, l'augmentation de la concentration cytosolique d'IP<sub>3</sub>, synthétisé par la phospholipase C, provoque l'ouverture de canaux calciques ce qui modifie grandement la concentration de calcium dans la cellule. Cette augmentation de la concentration en calcium provoque l'activation de la PKC. La PKC agit en catalysant le transfert d'un groupement phosphate d'un ATP vers les résidus sérine ou thréonine de sa séquence en acides aminés cibles (Ferguson 2001). C'est ce type de

désensibilisation qui fut la première reconnue dans le mécanisme de détachement des RCPG de leur protéine G provoquant la désensibilisation (Benovic, Pike et al. 1985). La phosphorylation du RCPG par la PKC se fait sur des résidus différents de celle induite par la GRK, mais le résultat final est le même, soit une désensibilisation du récepteur par la stabilisation du complexe RCPG/arrestine (Diviani, Lattion et al. 1997).

#### 1.4.3.3 $\beta$ -Arrestine

La phosphorylation des RCPG n'est pas la seule condition menant à la désensibilisation du récepteur. La liaison du récepteur à une protéine de type arrestine est aussi nécessaire à son détachement de la protéine G et à la formation d'endosomes. En forçant la phosphorylation des RCPG par l'ajout de phosphorylant chimique et d'inhibiteur de la déphosphorylation, une étude a montré que des cellules humaines avec un déficit en protéine arrestine présentaient une réduction significative de 50 % de la désensibilisation (Pippig, Andexinger et al. 1995). Les différentes classes d'arrestine peuvent être divisées en deux groupes distincts soit les arrestines visuelles, très impliquées dans les mécanismes de migration des protéines de la rétine et les  $\beta$ -arrestines, exprimées de façon ubiquitaire.

La phosphorylation du récepteur augmente la stabilité du complexe et donc la formation du complexe RCPG/arrestine entre dix et trente fois (Lohse, Andexinger et al. 1992). Ce complexe permet le recrutement de clathrine, une protéine structurale constituant l'enveloppe des endosomes. Cette protéine, en grand nombre, forme des puits de clathrine, formation initiale de l'endocytose (Pearse 1976).



**Figure 1.9** Mécanisme de désensibilisation des RCPG par les GRK et l'arrestine (Dzimir 1999).

## CHAPITRE II

### OBJECTIFS DU PROJET

En période d'exercice et de jeûne, les mécanismes de régulation sont mis à contribution pour maintenir l'homéostasie glucidique. L'augmentation de la concentration de glucagon, médiateur majeur de cette régulation, se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs au glucagon au niveau de la membrane plasmique (Melançon 2005). Toutes stimulations physiologiques confondues, peu de mesures cinétiques dans la réponse des récepteurs au glucagon existent actuellement. Une étude sur une période de 60 minutes en réponse au glucagon a été répertoriée et cette dernière a montré l'internalisation du récepteur (Merlen, Fabrega et al. 2006). Cependant, aucune donnée n'est disponible sur les protéines impliquées dans la désensibilisation du récepteur au glucagon. Aucune donnée n'existe sur le suivi des récepteurs au glucagon lors de stimuli physiologiques qui impliquent à la fois la sensibilisation et la désensibilisation.

L'objectif de ce projet était donc d'investiguer lors d'une période de jeûne et d'exercice, les cinétiques d'internalisation et d'externalisation des récepteurs au glucagon. Spécifiquement, nous avons mesuré les concentrations des trois protéines impliquées dans la désensibilisation (PKC, GRK et  $\beta$ -arrestine) et de deux protéines impliquées dans la signalisation des récepteurs au glucagon (LKB1 et AMPK).

Des animaux ont été assignés à deux conditions différentes : une période de jeûne (J6, J12 et J24) et post-24 heures de jeûne (PJ6, PJ12 et PJ24) et une période d'exercice (Ex90, Ex180)

et post-180 minutes d'exercice (Pex0, Pex1, Pex3, Pex12 et Pex24). Des animaux ont été sacrifiés pour chacun des groupes de jeûne et d'exercice.

Le glycogène hépatique, le glucose, l'insuline et le glucagon plasmatiques ont été mesurés. Les récepteurs membranaires au glucagon ont été mesurés par radio-liaison. Finalement, six protéines ont été dosées par immunobuvardage, la LKB1, l'AMPK, la GRK, la PKC, la  $\beta$ -arrestine et le RG dans les hépatocytes.

## CHAPITRE III

### MÉTHODOLOGIE

#### 3.1 Protocole expérimental

##### 3.1.1 Animaux

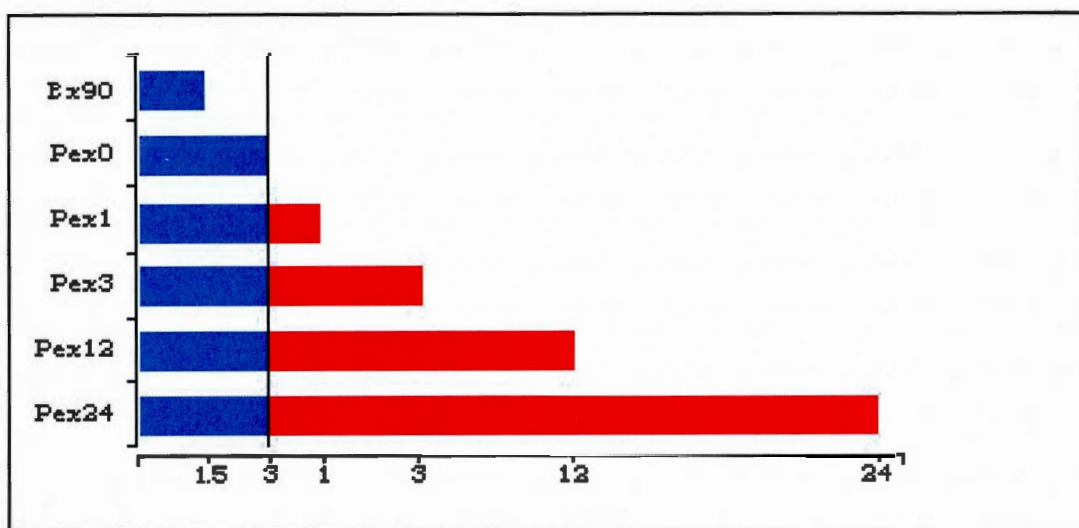
Les expérimentations faites dans le cadre de ce projet de maîtrise ont été réalisées avec des rats mâles Sprague-Dawley. Les expérimentations ont été faites en quatre phases chacune d'elles en respectant les mêmes conditions expérimentales. Les rats étaient placés dans des cages par groupe de deux. Ces cages étaient placées dans une pièce à température (22°C) et humidité (55 %) constantes et soumises à un cycle circadien de douze heures de nuit et douze heures de jour. Les animaux avaient libre accès (*ad libitum*) à l'eau et à la nourriture (sauf lors des protocoles de jeûne). Toutes les procédures avec les animaux respectaient les normes du Conseil canadien de protection des animaux et ont été approuvées par le Comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

##### 3.1.2 Exercice

Les animaux ont été assignés au hasard à différents groupes d'exercice et de récupération post-exercice avant d'être sacrifiés : un groupe repos (contrôle N=10), un groupe avec 90 minutes d'exercice (Ex90 n=10), un groupe avec 180 minutes d'exercice (Pex0 n=10), un groupe avec 180 minutes d'exercice puis 60 minutes de repos (Pex1 n=10), un groupe avec 180 minutes d'exercice puis 180 minutes de repos (Pex3 n=10), un groupe



avec 180 minutes d'exercice puis 12 h de repos (Pex12 n=10), un groupe avec 180 minutes d'exercice puis 24 h de repos (Pex24 n=10) (Figure 3.1). Le programme d'exercice consistait en un exercice de nage dans un bassin de 0,6 x 0,9 m contenant 50 cm d'eau à 37°C (Legare, Drouin et al. 2001). Les animaux étaient soumis à un programme d'acclimatation sur une période de trois jours, quatre jours avant le début du protocole. L'acclimatation consistait en une progression de la durée de nage de 15, 30 et 45 minutes respectivement. Les périodes de repos post-exercice étaient faites dans les cages initiales avec libre accès à l'eau et à la nourriture après 30 minutes de séchage sous lampe chauffante en cage individuelle. Pour chacun des sacrifices, les animaux étaient anesthésiés selon la procédure décrite en 3.1.4.

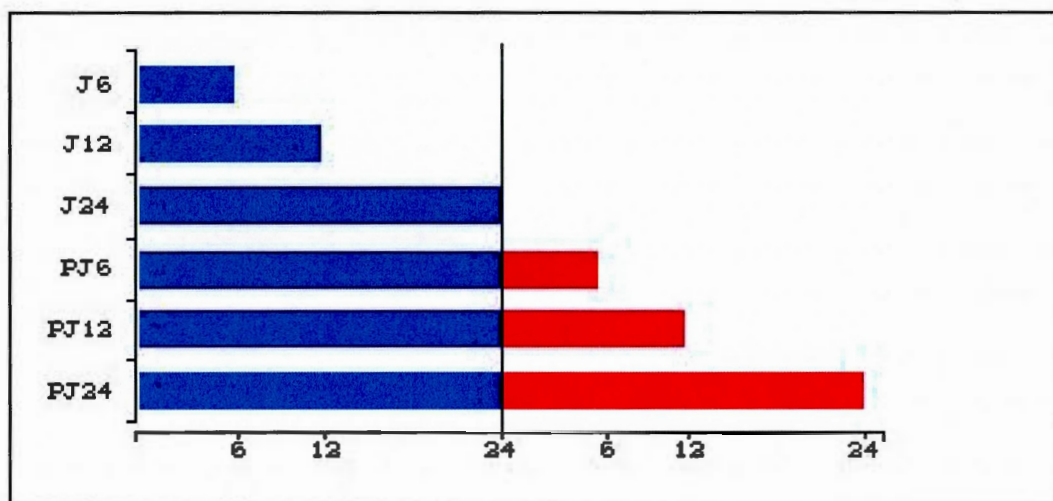


**Figure 3.1** Description des groupes d'exercice et de récupération post-exercice.

### 3.1.3 Jeûne

Les animaux ont été assignés au hasard à différents groupes de jeûne et de récupération post-24 h de jeûne avant d'être sacrifiés : un groupe nourri (contrôle N=7), un groupe avec 6 heures de jeûne (J6 n=7), un groupe avec 12 heures de jeûne (J12 n=7), un groupe avec 24 heures de jeûne (J24 n=7), un groupe avec 24 heures de jeûne suivies d'une période nourrie de 6 heures (PJ6 n=7), un groupe avec 24 heures de jeûne suivies d'une période nourrie de 12 heures (PJ12 n=7), un groupe avec 24 heures de jeûne suivies d'une période

nourrie de 24 heures (PJ24 n=7), (Figure 3.2). Pour la période de jeûne, les animaux étaient placés deux par cage avec libre accès à l'eau en absence de nourriture. Pour la période de récupération post-jeûne, les animaux étaient placés individuellement dans leur cage avec un libre accès à l'eau et à la nourriture. Avant et après chacune des étapes (jeûne et récupération post-jeûne), les rats de même que la nourriture étaient pesés avant et après la période nourrie.



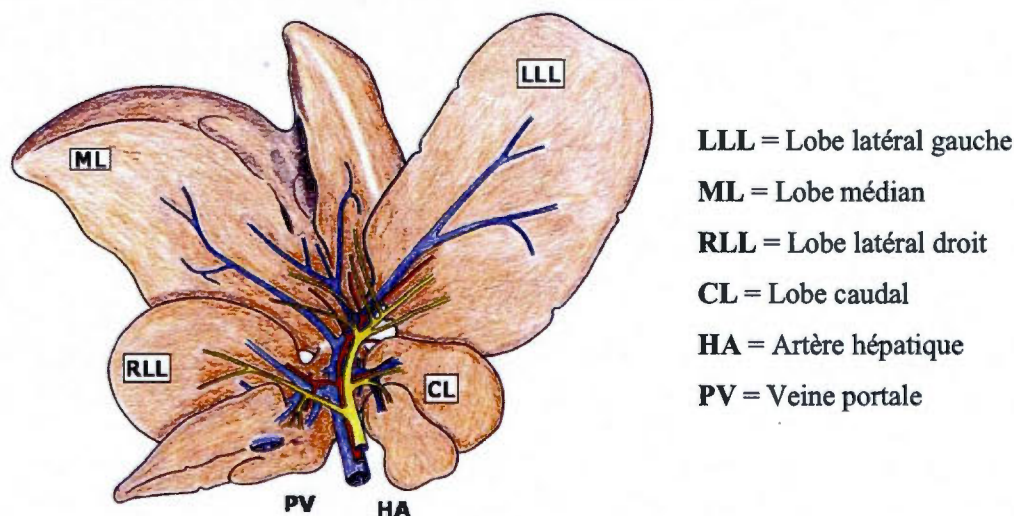
**Figure 3.2** Description des groupes de jeûne et de récupération post-jeûne.

### 3.1.4 Sacrifices et prélèvements des tissus

Les sacrifices ont été réalisés sous anesthésie. Les animaux de tous les groupes jeûne et exercice étaient anesthésiés à l'isoflurane par appareil d'anesthésie. Après laparotomie, le sang a été prélevé dans la veine cave abdominale à l'aide d'un cathéter et placé dans des tubes EDTA et un tube de verre contenant du trasyloïl pour le dosage de glucagon (Wu and Chen 1989; Wang, Ji et al. 2002). Après centrifugation à 3 000 G pendant dix minutes, le plasma a été récupéré, transféré dans des tubes de type eppendorf et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des analyses. Pour le foie, le lobe médian (Figure 3.3) a été prélevé et conservé dans une solution de sucrose à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les lobes latéraux ont été prélevés, le gauche a été placé dans l'isopropanol et le droit dans le Trisyl, un anti ARNase. Les deux tubes ont été déposés dans l'azote liquide pour congélation immédiate et entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux



analyses. Finalement, les animaux ont été euthanasiés par sectionnement de l'aorte. En plus de ces manipulations, trois muscles de la patte antérieure droite ont aussi été prélevés pré-laparotomie, afin d'être utilisés dans le cadre d'un autre projet.



**Figure 3.3** Figure descriptive des lobes hépatiques (adaptée de Aller, Arias et al. 2008).

### 3.1.5 Préparation et isolation des membranes plasmiques

L'isolation des membranes plasmiques des hépatocytes a été réalisée selon la procédure décrite par Taylor (Taylor, Uhing et al. 1985). Deux grammes du lobe médian du foie ont été placés dans une solution sucrose/HEPES (250 mM sucrose, 5 mM HEPES-KOH, 1 mM EGTA pH 7,4) puis broyés avec un homogénéisateur de style «douncer». L'homogénat obtenu correspond à la fraction de membranes totales. L'homogénat a été centrifugé dix minutes à 2 800 RPM puis décanté pour ne garder que le culot. Une solution sucrose/HEPES a été ajoutée de nouveau avec du Percoll avant d'être mélangée. L'échantillon a été ultracentrifugé durant 35 minutes à 35000 G. La première interphase contenant les membranes plasmiques a été récupérée. L'interphase a été mélangée à une solution de sucrose (250 mM Sucrose, 50 mM tris-HCl pH 8.0) et centrifugée 15 minutes à 4 000 RPM. Le culot contenant nos membranes a été récupéré et suspendu de nouveau dans un tampon HEPES (50 mM pH 7.6).

### 3.1.6 Préparation des hépatocytes

Les fractions protéiques des hépatocytes pour les immunobuvardages ont été préparées selon la procédure décrite par Cadrin (Cadrin, Hovington et al. 2000). Des extraits de foie conservés dans l'isopentane ont été homogénéisés dans du PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,29 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) contenant 2,3 % (p/v) SDS, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM leupeptin, 10 µM pepstatin, et 25 µg/ml aprotinin) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). Les échantillons ont ensuite été soniqués, puis centrifugés à 12 000 RPM pour 15 minutes. Le surnageant a été récolté et les protéines ont été dosées selon la méthode décrite en 3.1.7.

### 3.1.7 Dosage des protéines

Pour tout immunobuvardage et radiolisation, il importe de travailler avec une concentration précise de protéines. Les protéines des extraits cellulaires ont été dosées avec la trousse d'analyse Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, California, États-Unis). Le dosage est basé sur le principe de réaction d'une protéine avec une solution de tartrate de cuivre alcalin et de réactif Folin (1,2-naphthoquinone-4-sulfonate). Certains acides aminés des protéines en présence du tartrate de cuivre provoquent la réduction du Folin, causant la formation de complexe bleu ayant un maxima d'absorption entre 450 et 750 nm. La concentration en protéines des échantillons est directement proportionnelle à l'augmentation de la densité optique mesurée à 750 nm.

## 3.2 Protocoles d'analyse

### 3.2.1 Glucose

Dans les deux cinétiques, jeûne et exercice, les concentrations plasmatiques de glucose ont été dosées à l'aide de la trousse commerciale Glucose Infinity™ (Sigma-Aldrich,

Saint-Louis, Missouri États-Unis). Le réactif contient de l'hexokinase qui catalyse la phosphorylation, via l'adénosine triphosphate (ATP), du glucose. Le glucose-6-phosphate formé réagit avec une molécule d'adénine nicotinamide dinucléotide (NAD) pour former le 6-phosphogluconate. La réduction du NAD provoque une augmentation en NADH qui peut être dosée par spectrophotométrie. La concentration en glucose des échantillons est directement proportionnelle à l'augmentation de la densité optique à 340 nm.

### 3.2.2 Glycogène

Des extraits de foie préservés dans l'isopentane ont d'abord été lyophilisés et réduits en poudre. Le contenu en glycogène des échantillons a été déterminé par une méthode d'hydrolyse à l'acide décrite par Lauderdale (Passonneau and Lauderdale 1974). Une quantité prédéterminée de foie en poudre a été mélangée dans l'acide perchlorique 1,5 mol/L (Fisher Scientific, Nepean, ON) et placé sur glace pour une période de 20 minutes. Pour chaque échantillon, de l'acide chlorhydrique 1 mol/L a été ajouté et un petit volume a été prélevé et neutralisé avec du TRIZMA base 2 mol/L (Sigma-Aldrich) pour déterminer le glucose pré-hydrolyse. Les portions non neutralisées ont été placées dans un bain d'eau à 100°C pour deux heures pour être par la suite neutralisées avec du TRIZMA base 2 mol/L et centrifugées à 3 000 g pour cinq minutes. La concentration de glucose a été mesurée dans le surnageant afin de déterminer la valeur post-hydrolyse. Les concentrations de glucose pré et post-hydrolyse ont été mesurées avec la technique de dosage du glucose expliquée dans la section 3.2.1. La concentration de glycogène pour chaque échantillon a été obtenue en soustrayant la valeur pré-hydrolyse de la valeur post-hydrolyse.

### 3.2.3 Glucagon

Les concentrations plasmatiques de glucagon ont été déterminées par une méthode radio-immunologique utilisant un essai disponible commercialement. La trousse de dosage du glucagon (Inter Medico, Markham, Ontario, Canada) fonctionne selon un principe de compétitivité de l'hormone pour son anticorps. Un échantillon plasmatique est déposé dans

une solution contenant une quantité précise d'anticorps anti-glucagon et laissée à température pièce pour 24 heures. Une quantité de glucagon marqué à l'iode<sup>125</sup> est ensuite déposée puis laissée à réagir. Les complexes anticorps-antigène sont ensuite mélangés à une solution précipitante et centrifugées. Les culots sont comptés par compteur gamma (Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA) et le compte, en CPM, permet de déterminer à l'aide d'une courbe standard la concentration en glucagon.

#### 3.2.4 Insuline

Les concentrations plasmatiques d'insuline ont été déterminées par une méthode radio-immunologique utilisant un essai disponible commercialement. La trousse de dosage de l'insuline (Médicorp, Montréal, Québec, Canada) fonctionne selon un principe de compétitivité de l'hormone pour son anticorps. Un échantillon plasmatique est déposé dans un tube enrobé (coating) avec l'anticorps anti-insuline et laissé au réfrigérateur pour 24 heures. Une quantité d'insuline marquée à l'iode<sup>125</sup> est ensuite déposée puis laissée à réagir. Les tubes sont alors décantés et comptés par compteur gamma (Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA) et le compte, en CPM, permet de déterminer à l'aide d'une courbe standard la concentration en insuline.

#### 3.2.5 Radio-liaison

La technique utilisée par notre laboratoire pour l'épreuve de radiolisation des membranes plasmiques est celle de Légaré et coll (Legare, Drouin et al. 2001) adaptée de Frandsen et coll. (Frandsen, Thim et al. 1985). L'iodation du glucagon est réalisée commercialement à l'aide d'une technique de lactoperoxidase et purifiée par chromatographie liquide de haute performance (<sup>125</sup>I-glucagon, NEN Life Science Products, Boston, MA). Les membranes plasmiques (10 µg de protéines/150 µl) ont été incubées en présence de glucagon marqué à l'iode<sup>125</sup> à des concentrations allant de 0,15 à 3,00 nmol/L et d'une solution de tampon HEPES 50 mM à pH 7,6 contenant 1 % d'albumine sérique humaine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri États-Unis) pour un volume total de 150 µl.



La période d'incubation a été de 30 minutes à 30 °C. Suite à la période d'incubation, 100 µl de la solution ont été retirés pour être ajoutés à 200 µl d'une solution de tampon HEPES pH 7,6 contenant 2,5 % d'albumine sérique humaine à 4 °C. Les membranes plasmiques liées et non-liées ont été séparées par centrifugation à 10 000 g pendant cinq minutes pour ne garder que le culot contenant les membranes plasmiques liées au I<sup>125</sup>-glucagon. Le culot a été lavé avec une solution de tampon HEPES pH 7,6 contenant 2,5 % d'albumine sérique humaine et la radioactivité liée à la liaison du I<sup>125</sup>-glucagon aux membranes plasmiques a été déterminée par compteur gamma (Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA). La présence de liaison non-spécifique a été mesurée suite à l'incubation des membranes plasmiques dans une solution contenant du glucagon non marqué en excès (3 µmol/L) et des concentrations de I<sup>125</sup>-glucagon (0,15 - 3,00 nmol/L) correspondant à chacune des concentrations utilisées pour obtenir la courbe de saturation.

### 3.2.6 Immunobuvardage

Les échantillons d'hépatocytes ont été préalablement préparés selon la méthode décrite en 3.1.6 et les protéines ont été dosées selon la méthode décrite en 3.1.7. Un aliquot de 35 µg de protéines par échantillon est mélangé dans un ratio 1:2 dans une solution de chargement (12 % Tris-HCl pH=6,8; 25 % glycérol; 0,2 % SDS; 0,01 % bleu de Bromophénol; 0,05 % β-mercaptoéthanol) et placé dans un bain d'eau à 100°C durant deux minutes. Les échantillons sont déposés sur un gel de bis-acrylamide 10 % dans une solution d'électrophorèse (0,0025 M Tris-base, 0,02 M glycine, 0,01 % SDS). L'électrophorèse a été réalisée sur un module mini-PROTEAN® durant 2 h 30 à un voltage constant de 120V. Le gel a ensuite été retiré et déposé dans une cassette à immunobuvardage en contact avec une membrane de nitrocellulose dans une solution de transfert (25 mM de Tris-Base, 192 mM glycine, 20 % méthanol) et placé dans une cuve de transfert pour 1 h 30 à un ampérage constant de 300 mA. La membrane de nitrocellulose a ensuite été bloquée dans une solution de PBS (1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) avec 5 % lait en poudre et 0,05 % tween®20. Les membranes ont été placées dans une solution (Tableau 3.3) contenant l'anticorps primaire (dans du PBS-tween®20-lait 5 %) approprié durant toute une nuit. Les

membranes sont ensuite nettoyées dans le PBS-tween®20 et placées dans une solution de PBS contenant l'anticorps secondaire correspondant pour quatre heures. Les membranes ont ensuite été nettoyées dans le PBS-tween®20. Les membranes ont finalement été révélées avec de la solution West Femto® (ThermoFisher Sci, Waltham, Massachusetts, États-Unis) dans l'Epi Chemi II darkroom (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA) et analysées par le programme Labworks 4,6 (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA).

**Tableau 3.1**  
Anticorps primaires

Antigènes	Poids moléculaire (kD)	Source de l'anticorps	Fournisseur	# catalogue
PKC	80	Souris	Santa Cruz Biotechnologie	sc-17804
GRK 2	80	Lapin		sc-562
AMPK 1/2	63	Souris		sc-74461
RG	62	Chèvre	*	N/A
$\beta$ -Arrestine 1/2	55	Souris	Santa Cruz Biotechnologie	sc-74591
LBK1	52	Lapin		sc-28788
$\beta$ -Actine marquée	42	Souris	Sigma-Aldrich	A3854

\*L'anticorps anti-RG est un don du Dr Cecille Unson de l'Université Rockefeller.

### 3.3 Protocoles statistiques

#### 3.3.1 Métabolites

Les résultats sont exprimés en moyenne de n variable avec leur SEM. Le n est le même pour chacun des groupes d'une même condition, soit huit à dix rats par groupe soumis à l'exercice et cinq à sept rats par groupe soumis au jeûne. Le groupe contrôle est de huit à dix rats n'ayant été soumis à aucun des deux types de test correspondant au groupe repos et nourri.



### 3.3.2 Récepteurs au glucagon

L'analyse de la courbe de saturation a été exécutée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) afin d'obtenir la densité (Bmax) et l'affinité (Kd) des récepteurs au glucagon. Les résultats sont exprimés selon le maximum de liaison (Binding max) déterminé en pmol de récepteurs par mg de protéines.

### 3.3.3 Protéines

Les résultats sont présentés en unités arbitraires de concentration. Les densités des bandes ont été calculées avec le programme d'analyse Quantity One (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). Chaque densité de protéines a été rapportée sur son équivalent sur la bande de  $\beta$ -actine.

### 3.3.4 Analyse statistique

Les valeurs ont été analysées par SigmaStat (Systat, Chicago, Illinois, États-Unis) avec un test ANOVA contre le groupe contrôle. Un seuil significatif de  $P < 0,05$  a été retenu.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS

**Tableau 4.1**

Rappel des temps d'exercice, de repos post-exercice, de jeûne et de réplétion post-jeûne pour chacun des groupes

	Exercice	Repos post-exercice		Jeûne	Réplétion post-jeûne
<b>Ctrl</b>	N/A	N/A	<b>Ctrl</b>	N/A	N/A
<b>Ex90</b>	1,5 heure	N/A	<b>J6</b>	6 heures	N/A
<b>Pex0</b>	3 heures	N/A	<b>J12</b>	12 heures	N/A
<b>Pex1</b>	3 heures	1 heure	<b>J24</b>	24 heures	N/A
<b>Pex3</b>	3 heures	3 heures	<b>PJ6</b>	24 heures	6 heures
<b>Pex12</b>	3 heures	12 heures	<b>PJ12</b>	24 heures	12 heures
<b>Pex24</b>	3 heures	24 heures	<b>PJ24</b>	24 heures	24 heures

#### 4.1 Masses et nourriture ingérée

Chez les animaux du protocole jeûne, on constate une prise de masse post-jeûne supérieure à la moyenne de prise de masse habituelle sur une période de 24 h ( $\approx 5,94$  g chez les rats nourris contre  $\approx 12,8$  g chez les rats après 24 heures post-jeûne). Cette hausse de la prise de masse est due à un plus grand appétit, puisque la moyenne de nourriture ingérée chez un rat sain durant 24 h est de 25,7 g contre 41,5 g durant les 24 h post-jeûne.

**Tableau 4.2**  
Variation de masse des animaux au jeûne face au groupe contrôle  
(en grammes)

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
<b>Jeûne</b>	317,79 ±8,89	-8,61 ±3,44	-15,3 ±4,11*	-20,40 ±4,97*			
<b>Post-jeûne</b>	N/A				-1,82 ±1,11	+18,07 ±9,69*	+33,2 ±3,10*

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

#### 4.2 Glucose plasmatique et glycogène hépatique

Le taux de glucose plasmatique se situe dans une fourchette de concentration équivalente aux valeurs normales attendues chez le rat. Aucun changement statistiquement significatif ne s'effectue au niveau de la glycémie chez les rats au jeûne et ce, tout au long de la cinétique. Cette absence de changement statistiquement significatif est marquée par le fait que les réserves de glycogène hépatique chez les rats testés sont grandement déplétées (98 %).

**Tableau 4.3**  
Concentration plasmatique de glucose au jeûne  
(mmol/L)

	Ctrl	J6	J12	J24	Pj6	PJ12	PJ24
<b>JEÛNE</b>	10,82 ±1,29	12,28 ±1,53	9,67 ±1,07	9,21 ±1,18	12,25 ±0,90	13,33 ±1,91	13,16 ±0,93

**Tableau 4.4**  
Concentration hépatique en glycogène chez les animaux au jeûne  
( $\mu\text{mol}$  unités glycosyl/kg de foie sec)

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
<b>Glycogène</b>	323,1 $\pm 25,5$	197,5 $\pm 31,5^*$	11,8 $\pm 3,9^*$	5,4 $\pm 1,8^*$	263,9 $\pm 25,4^*$	433,5 $\pm 52,6$	504,6 $\pm 43,7^*$
<b>% Vs Ctrl</b>	0%	-39 %	-96 %	-98 %	-18 %	34 %	56 %

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

#### 4.3 Glucagon et insuline plasmatiques

On ne note aucune valeur statistiquement significative en ce qui a trait aux concentrations plasmatiques en glucagon dans la cinétique de jeûne, cependant le très grand SEM attribué à la valeur contrôle pourrait expliquer en partie cette absence de modification. Si on débute la lecture des résultats avec les valeurs à six (6) heures de jeûne on note cependant des changements significatifs. Chez les animaux soumis au test du jeûne, on note une diminution du taux de glucagon plasmatique durant la période de jeûne suivie d'un rapide retour à la normale suivant la prise de nourriture. 24 heures après le jeûne, les valeurs sont revenues très près du groupe contrôle ( $91 \pm 19$  % de la valeur contrôle).

Chez les animaux à jeun, la diminution de la concentration d'insuline plasmatique est statistiquement significative durant la période de jeûne, mais on note une augmentation statistiquement significative des valeurs 24 heures suivant le jeûne (140 % de la valeur contrôle).

Le ratio nous montre des données semblables aux variations des hormones, soit l'augmentation statistiquement significative du ratio glucagon/insuline pendant le jeûne suivi de retour aux valeurs du groupe contrôle.

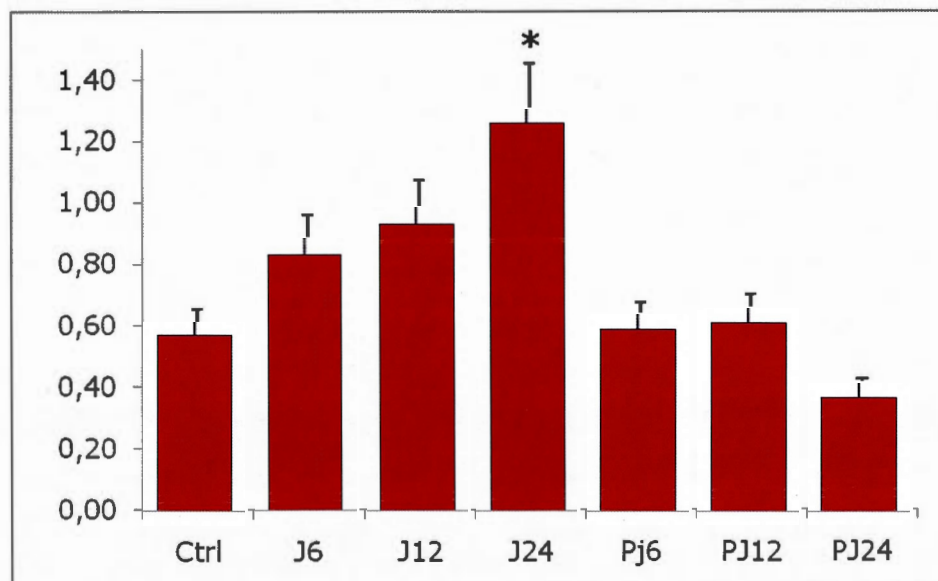
**Tableau 4.5**  
Concentration plasmatique de glucagon au jeûne  
(pmol/L)

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
<b>JEÛNE</b>	22,57 ±7,37	15,79 ±3,24	14,22 ±3,17	13,08 ±2,29	15,38 ±4,35	20,28 ±3,40	20,54 ±4,20

**Tableau 4.6**  
Concentration plasmatique d'insuline au jeûne  
(pmol/L)

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
<b>JEÛNE</b>	39,63 ±3,67	18,97 ±2,79*	15,25 ±1,76*	10,36 ±1,03*	26,14 ±2,83*	33,244 ±2,74	55,81 ±4,99*

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

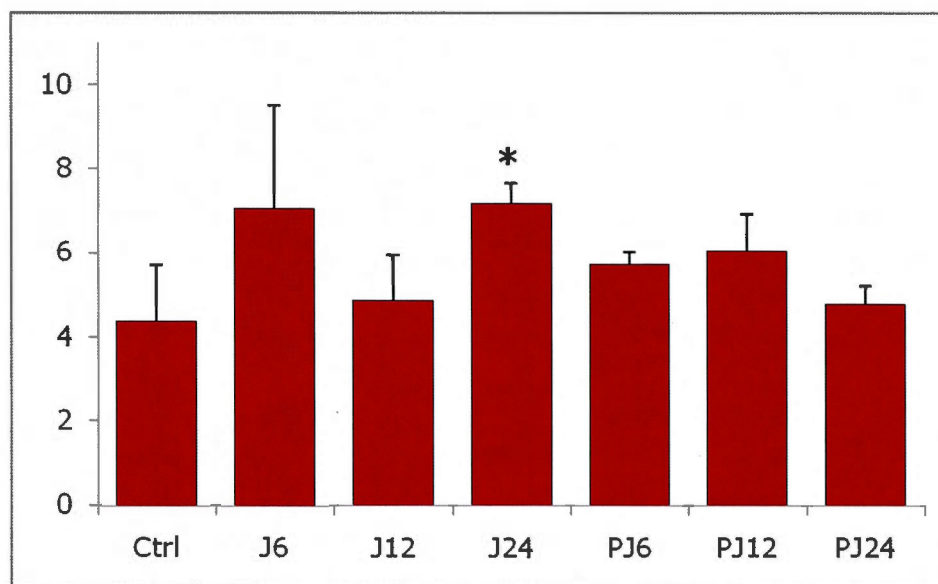


\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.1** Variation du ratio glucagon/insuline au jeûne.

#### 4.4 Récepteurs au glucagon membranaires

La densité en récepteurs membranaires chez les animaux soumis au jeûne et à un repos post-jeûne présente une hausse significative après 24 heures de jeûne (J24 à une valeur correspondant à 165 % de celle du groupe contrôle). Cette hausse est accompagnée d'un retour à la normale dès la période post-jeûne.



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.2** Densité des RG sur les membranes plasmiques des hépatocytes au jeûne (pmol/mg de protéines).

#### 4.5 Analyse des protéines par immunobuvardage

##### 4.5.1 Récepteur au glucagon



Le tableau 4.7 montre un immunobuvardage de type western représentatif obtenue en utilisant l'anticorps anti-récepteur au glucagon. Les quantités relatives de densitométrie indiquent une augmentation du nombre de récepteurs (1,35 à Pex0) suivie d'une diminution

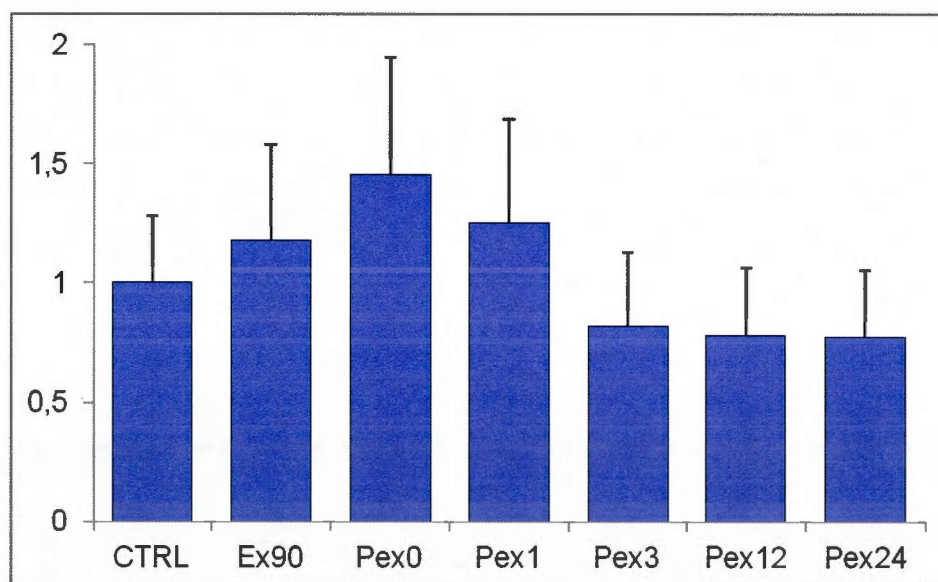


en période post-exercice (en moyenne 0,74 pour Pex3, PEx12 et Pex24). Ces différences sont cependant non-significatives.

Dans le cadre de ce présent projet, le récepteur au glucagon n'a pas été suivi en période de jeûne et de post-jeûne.

**Tableau 4.7**  
Quantité relative des RG totaux à l'exercice

	Ctrl	Ex90	Pex0	Pex1	Pex3	Pex12	Pex24
<b>RG</b>							
	1,00 ±0,28	1,17 ±0,41	1,45 ±0,49	1,26 ±0,44	0,82 ±0,31	0,78 ±0,28	0,77 ±0,28
<b>β-actin</b>							



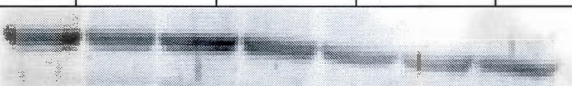


**Figure 4.3** Quantité relative des RG totaux à l'exercice (exprimée en valeur arbitraire).

#### 4.5.2 Protéines de signalisation du RG

L'analyse des immunobuvardages montre que la quantité d'AMPK hépatique chez les rats des groupes d'exercice et de post-exercice montre une augmentation suite à trois heures d'exercice (36 % d'augmentation) et diminue durant la période de repos (70 % de diminution trois heures suivant la fin de l'exercice) pour revenir aux valeurs du groupe contrôle. Dans le cas des groupes soumis au jeûne, on note peu de changements dans la densité de l'AMPK.


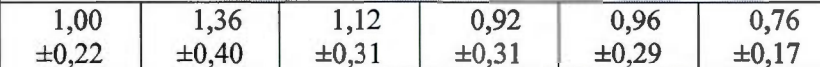

Pour ce qui est de la LKB1, des groupes de rats soumis à l'exercice et à un repos post-exercice, les quantités sont diminuées par rapport à celles du groupe contrôle, mais peu de changements sont observés. Dans le cas des groupes au jeûne et au post-jeûne, on dénote peu de tendances marquées.

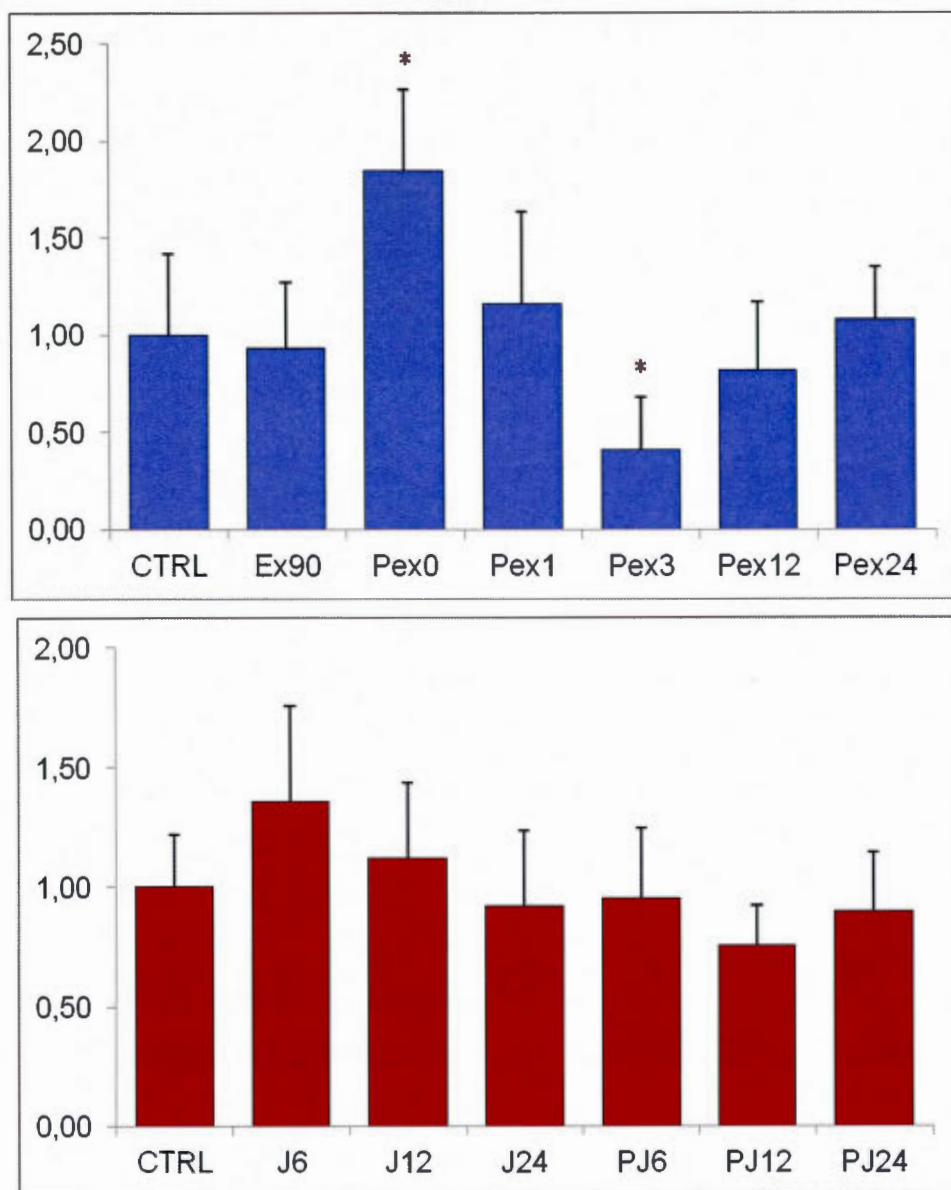
**Tableau 4.8**  
Quantité relative des protéines de signalisation à l'exercice

	Ctrl	Ex90	Pex0	Pex1	Pex3	Pex12	Pex24
<b>AMPK</b>							
	1,00 ±0,42	0,93 ±0,34	1,84* ±0,42	1,16 ±0,47	0,41* ±0,27	0,82 ±0,35	1,08 ±0,27
<b>LKB1</b>							
	1,00 ±0,25	0,83 ±0,28	1,18 ±0,48	0,72 ±0,28	0,68 ±0,27	0,67 ±0,33	0,93 ±0,48
<b>β-actin</b>							

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

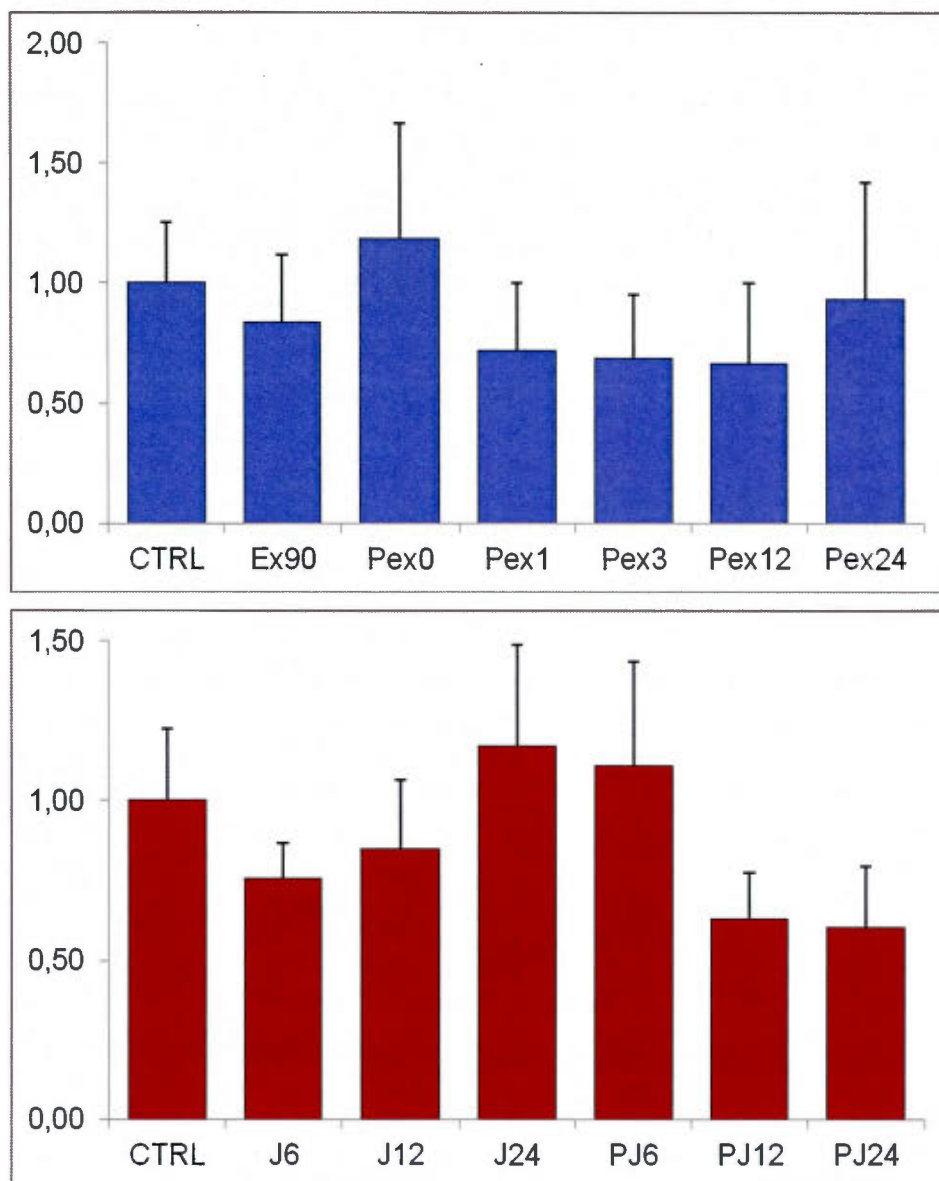
**Tableau 4.9**  
Quantité relative des protéines de signalisation au jeûne

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
AMPK							
	1,00 ±0,22	1,36 ±0,40	1,12 ±0,31	0,92 ±0,31	0,96 ±0,29	0,76 ±0,17	0,90 ±0,24
LKB1							
	1,00 ±0,23	0,76 ±0,111	0,85 ±0,22	1,17 ±0,32	1,11 ±0,32	0,63 ±0,14	0,60 ±0,19
β-actin							



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.4** Quantité relative de l'AMPK (exprimée en valeur arbitraire).



**Figure 4.5** Quantité relative de la LKB1 (exprimée en valeur arbitraire).

#### 4.5.3 Protéines de désensibilisation

Les quantités de PKC montrent des profils très variables desquels il est difficile d'établir une tendance claire, cependant on note une diminution globale de la PKC chez les animaux soumis à l'exercice et à une période post-exercice comparativement à une hausse







chez les rats soumis au jeûne. Ces changements représentent respectivement une baisse de 43 % et une hausse de 23 % en moyenne pour l'ensemble de la cinétique comparé au contrôle.

Les densités de GRK présentent, dans les deux situations, un profil semblable, soit une faible diminution, de 30 % dans les deux cas, par rapport à la densité des GRK du groupe contrôle.

Les densités de  $\beta$ -arrestine montrent des tendances inverses en ce qui a trait à l'exercice et au jeûne. On note une augmentation de la protéine durant le jeûne (185 % de la valeur du Ctrl à PJ12) contrairement à une diminution de 56 % après 24 h de repos post-exercice.

Pour les trois protéines, on ne perçoit aucun retour vers les valeurs contrôles dans la tendance et ce 24 heures suivant la fin du stimulus subi par l'animal.

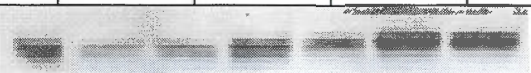


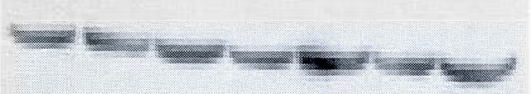
**Tableau 4.10**  
Quantité relative des protéines de désensibilisation à l'exercice

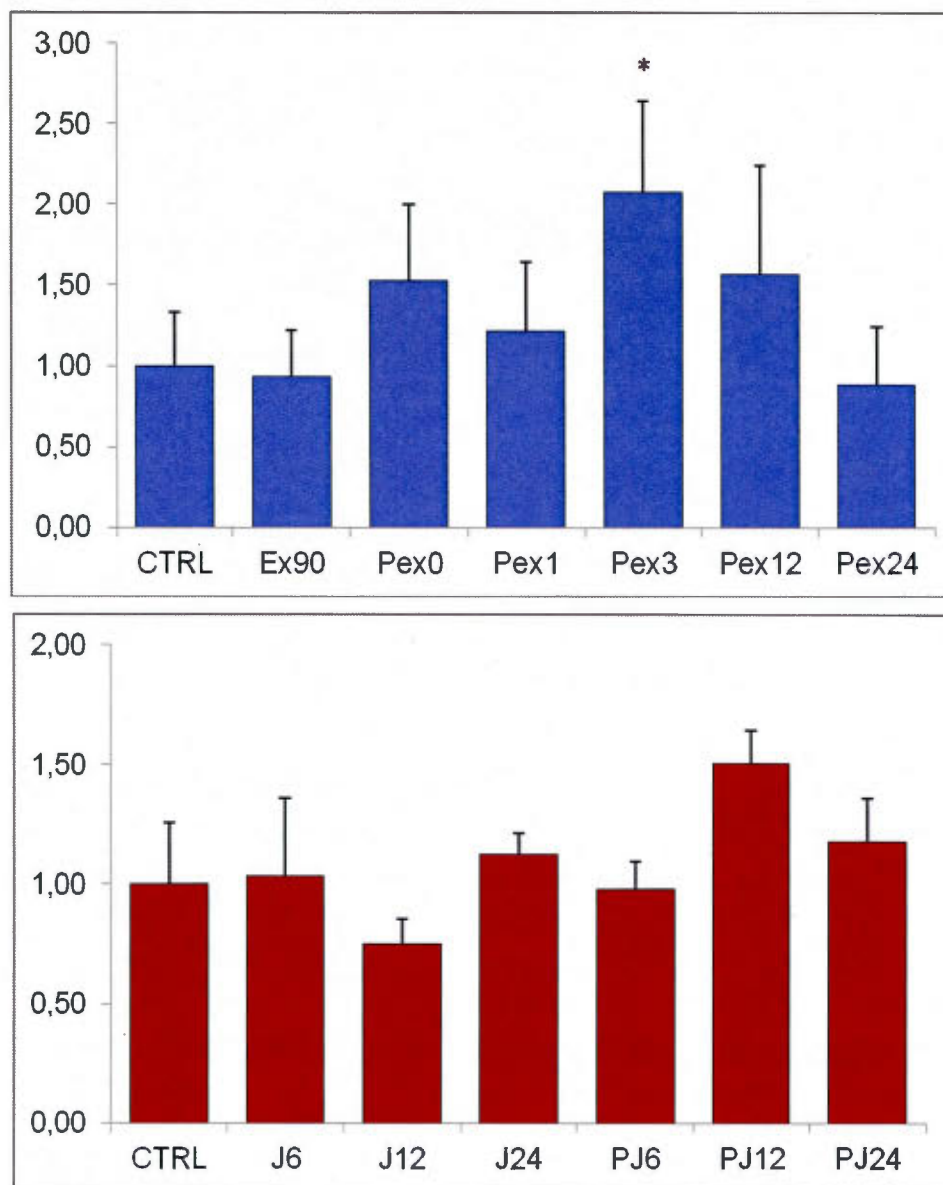
	Ctrl	Ex90	Pex0	Pex1	Pex3	Pex12	Pex24
<b>PKC</b>							
	1,00 $\pm 0,33$	0,93 $\pm 0,29$	1,52 $\pm 0,48$	1,21 $\pm 0,43$	2,07* $\pm 0,57$	1,57 $\pm 0,67$	0,88 $\pm 0,36$
<b>GRK</b>							
	1,00 $\pm 0,21$	1,41 $\pm 0,43$	1,57* $\pm 0,38$	1,32 $\pm 0,54$	1,05 $\pm 0,39$	1,25 $\pm 0,48$	0,88 $\pm 0,29$
<b><math>\beta</math>-arrestine</b>							
	1,00 $\pm 0,49$	1,20 $\pm 0,42$	0,98 $\pm 0,36$	1,07 $\pm 0,37$	1,03 $\pm 0,34$	0,73 $\pm 0,27$	0,75 $\pm 0,24$
<b><math>\beta</math>-actin</b>							

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle



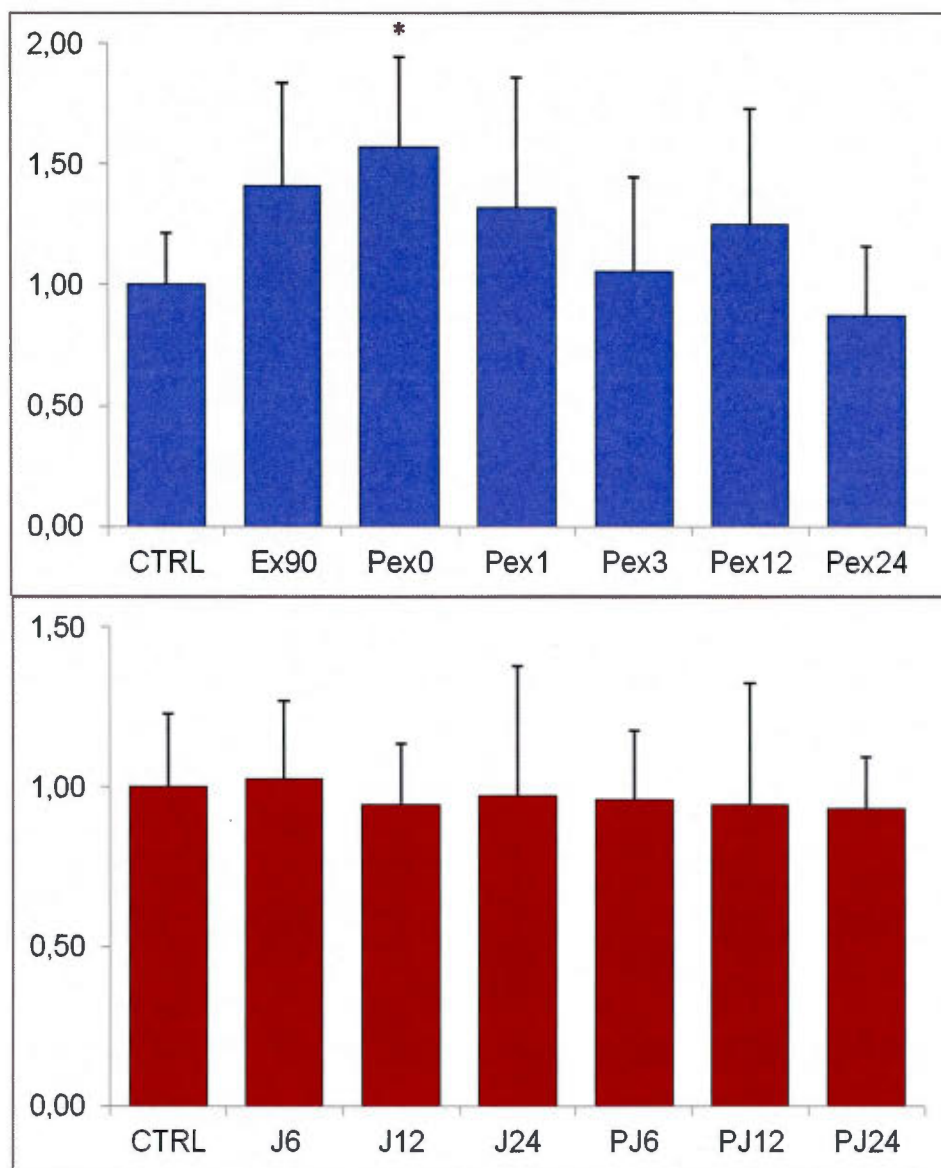
**Tableau 4.11**  
Quantité relative des protéines de désensibilisation au jeûne

	Ctrl	J6	J12	J24	PJ6	PJ12	PJ24
<b>PKC</b>							
	1,00 ±0,26	1,04 ±0,32	0,75 ±0,11	1,13 ±0,09	0,98 ±0,12	1,51 ±0,13	1,18 ±0,18
<b>GRK</b>							
	1,00 ±0,23	1,03 ±0,24	0,95 ±0,19	0,97 ±0,41	0,96 ±0,22	0,95 ±0,38	0,93 ±0,16
<b>β-arrestine</b>							
	1,00 ±0,08	0,94 ±0,09	0,93 ±0,14	1,14 ±0,21	1,17 ±0,15	1,28 ±0,28	0,93 ±0,17
<b>β-actin</b>							



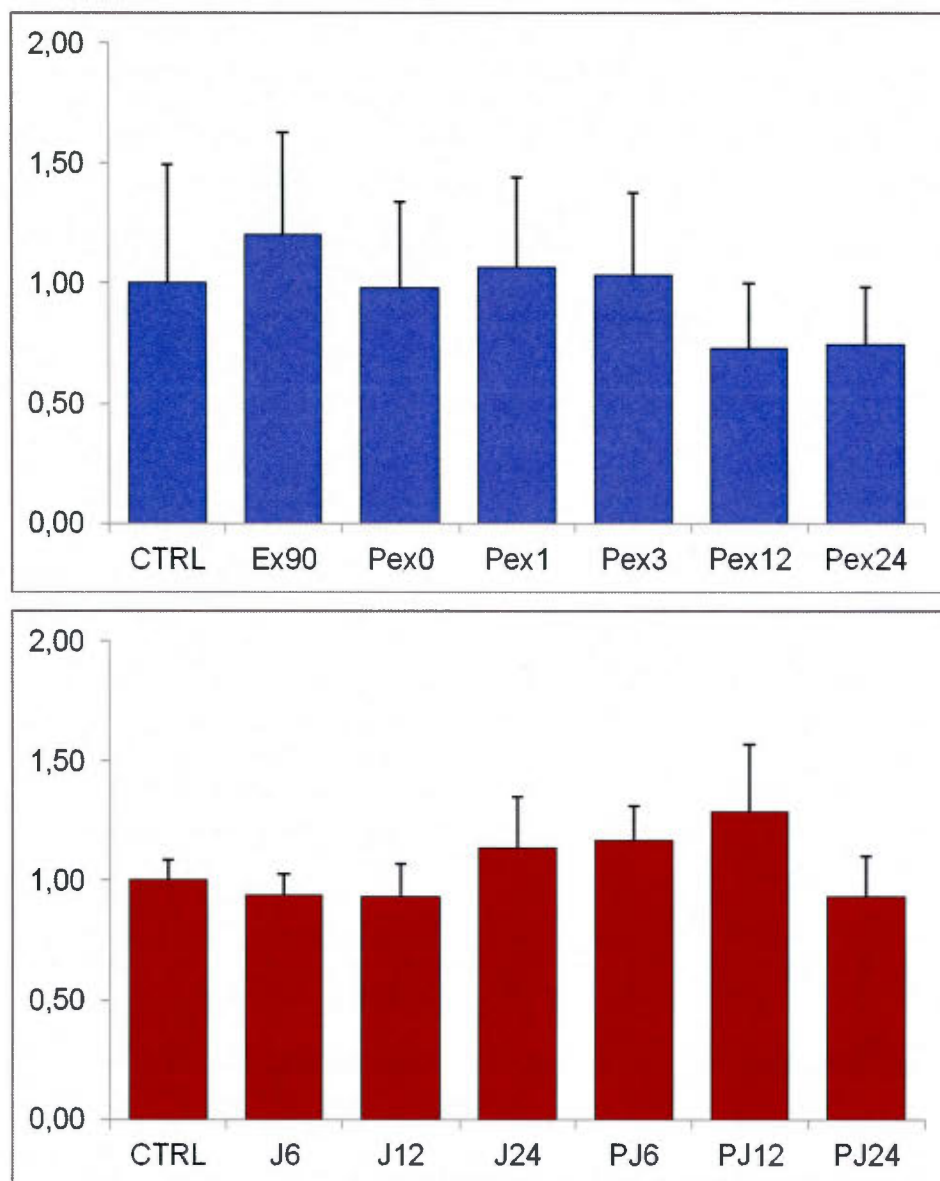
\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.6** Quantité relative de la PKC (exprimée en valeur arbitraire).



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.7** Quantité relative de la GRK (exprimée en valeur arbitraire).



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 4.8** Quantité relative de la  $\beta$ -arrestine (exprimée en valeur arbitraire).

## CHAPITRE V

### RÉSULTATS ANNEXÉS DE LA CINÉTIQUE D'EXERCICE

Ces résultats proviennent du mémoire de maîtrise ainsi que du projet de doctorat en cours de M. Alexandre Melançon (Melançon 2005; Melançon, Gagnon et al. 2011). Ils servent à la fois de base au projet et de structure comparative puisque ces données ont servi à mettre en place le projet ainsi qu'à orienter les recherches.

**Tableau 5.1**  
Rappel des temps d'exercice et de repos post-exercice pour chacun des groupes

	Exercice	Repos post-exercice
<b>Ctrl</b>	N/A	N/A
<b>Ex90</b>	1,5 heure	N/A
<b>Pex0</b>	3 heures	N/A
<b>Pex1</b>	3 heures	1 heure
<b>Pex3</b>	3 heures	3 heures
<b>Pex12</b>	3 heures	12 heures
<b>Pex24</b>	3 heures	24 heures

### 5.1 Glucose plasmatique et glycogène hépatique

**Tableau 5.2**  
Concentration plasmatique de glucose à l'exercice  
(mmol/L)

	<b>Ctrl</b>	<b>Ex90</b>	<b>Pex0</b>	<b>Pex1</b>	<b>Pex3</b>	<b>Pex12</b>	<b>Pex24</b>
<b>Glucose</b>	10,82 ±1,29	8,05 ±0,85	9,16 ±0,58	7,50 ±1,00	7,99 ±1,24	7,87 ±1,40	11,36 ±0,78

**Tableau 5.3**  
Concentration hépatique en glycogène chez les animaux à l'exercice  
( $\mu$ mol unités glycosyl/kg de foie sec)

	<b>Ctrl</b>	<b>Ex90</b>	<b>Pex0</b>	<b>Pex1</b>	<b>Pex3</b>	<b>Pex12</b>	<b>Pex24</b>
<b>Glycogène</b>	323,1 ±25,5	228,2 ±39,7*	83,7 ±21,5*	203,9 ±47,3*	136,3 ±32,3*	331,9 ±76,9	313,7 ±45,6
<b>% vs Ctrl</b>	0 %	-29 %	-74 %	-37 %	-58 %	3 %	-3 %

\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

### 5.2 Glucagon et insuline plasmatique

**Tableau 5.4**  
Concentration plasmatique de glucagon à l'exercice  
(pmol/L)

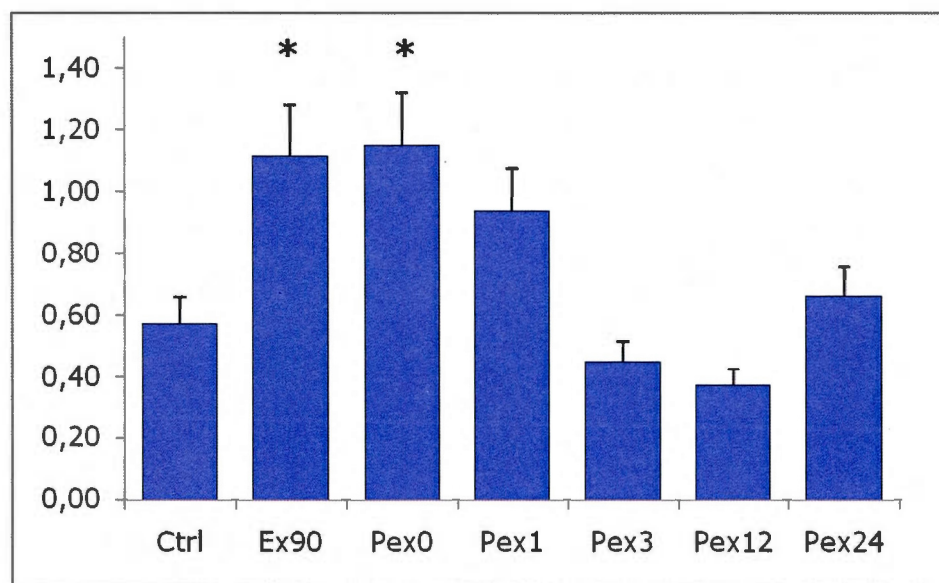
	<b>Ctrl</b>	<b>Ex90</b>	<b>Pex0</b>	<b>Pex1</b>	<b>Pex3</b>	<b>Pex12</b>	<b>Pex24</b>
<b>EXERCICE</b>	22,57 ±7,37	18,15 ±1,20	19,06 ±1,67	20,31 ±2,70	15,57 ±3,05	12,89 ±2,28	21,13 ±2,26



**Tableau 5.5**  
Concentration plasmatique d'insuline à l'exercice  
(pmol/L)

	Ctrl	Ex90	Pex0	Pex1	Pex3	Pex12	Pex24
<b>EXERCICE</b>	39,63 ±3,67	16,28 ±1,95*	16,60 ±1,80*	21,73 ±4,37*	34,82 ±4,29	34,95 ±5,47	32,17 ±2,60

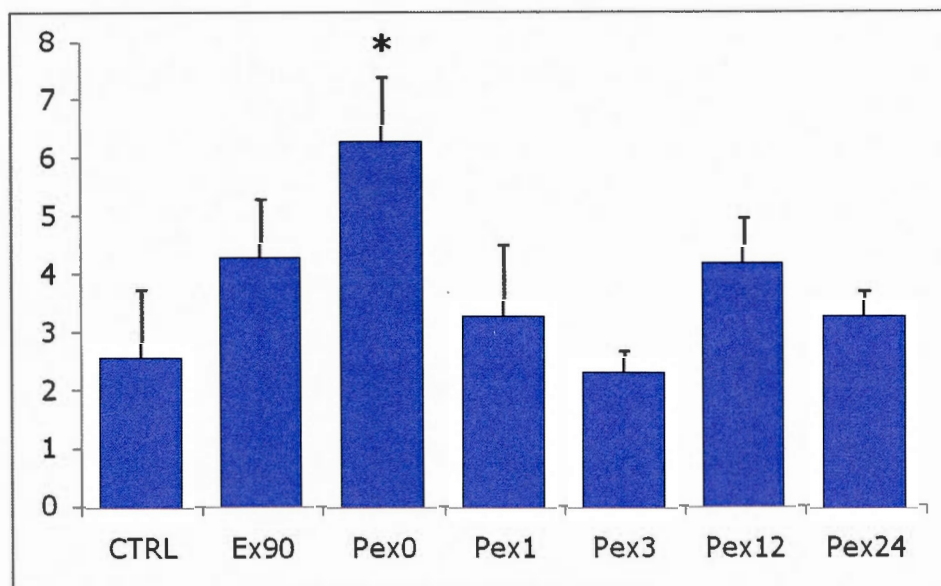
\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 5.1** Variation du ratio glucagon/insuline à l'exercice.

### 5.3 Récepteurs au glucagon membranaires



\*  $P < 0,05$  vs groupe contrôle

**Figure 5.2** Densité des RG sur les membranes plasmiques des hépatocytes (pmol/mg de protéines).

## CHAPITRE VI

### DISCUSSION

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient de suivre, lors de deux cinétiques distinctes, les variations de certaines protéines impliquées dans le mouvement et la signalisation du récepteur au glucagon. La première cinétique consistait à suivre l'effet d'exercice de durées variables et la récupération progressive à la suite d'un exercice de 180 minutes. La deuxième cinétique consistait à suivre l'effet de périodes de jeûne croissantes et la récupération progressive à la suite d'une période de jeûne de 24 heures.

Le présent projet fait parti d'un projet global qui consiste à comprendre les changements des propriétés de liaison du récepteur au glucagon sur les mécanismes de régulation glucidique hépatique. Certains résultats, principalement ceux obtenus lors de la cinétique d'exercice seront plus brièvement abordés puisqu'ils font parti des travaux de doctorat de M. Alexandre Melançon.

#### 6.1 Techniques utilisées

L'expérimentation qui a mené à ce mémoire est divisée en quatre étapes distinctes : 1) le protocole animal, 2) les dosages de substrats et d'hormones, 3) la cinétique par radio-liaison et 4) la cinétique par immunobuvardage.

La première étape consiste en la récolte de tissus animaux *in vivo* pour tous les tests sélectionnés. L'utilisation de la nage en bassin plutôt que la course sur tapis roulant de même que la période d'acclimatation permet de réduire le stress chez les rats et d'ainsi éviter les sources de biais (Légaré, Drouin et al. 2001; Kiraly, Bates et al. 2007). Afin de minimiser les risques de biais et d'interactions médicamenteuses avec le foie, les animaux ont été anesthésiés sous cloche de verre saturée à l'isoflurane ou directement via le masque de l'appareil à anesthésie. Ces deux méthodes ont permis de réduire le délai entre la fin de l'expérimentation et le début des prélèvements tout en minimisant le stress pour l'animal. L'ordre de prélèvement des tissus permet de récolter un maximum de tissus sans endommager les prélèvements subséquents. Dans tous les sacrifices, le temps entre l'anesthésie et l'euthanasie par section de l'aorte n'a jamais dépassé les 10 minutes.

La deuxième étape consiste à effectuer plusieurs dosages de substrats et d'hormones qui viendront décrire l'environnement des hépatocytes. Dans les tests effectués, les substrats ont été dosés uniquement dans le plasma sanguin puisque les érythrocytes et les leucocytes ont été éliminés par centrifugation. De ce plasma, des tests enzymatiques par spectrophotométrie permettent de doser la concentration de glucose, de lactate et d'acides gras libres. Des tests de détection radioimmunologique permettent de doser l'insuline et le glucagon, les deux hormones ayant un rôle primordial dans le contrôle de la glycémie. Dans les deux cas, le test correspond à une compétition entre l'hormone présente dans le plasma ainsi qu'une molécule marquée à l'iode<sup>125</sup> (glucagon ou insuline) pour une quantité fixe d'anticorps. Pour finir, un dosage du glycogène hépatique est effectué afin de suivre l'effet de la période d'exercice ou de jeûne sur les réserves de glycogène hépatique.

Troisièmement, une cinétique par radio-liaison des récepteurs au glucagon dans les cellules hépatiques permettra d'établir l'effet de l'exercice et du jeûne sur les propriétés des récepteurs au glucagon. La technique de Taylor adaptée par notre laboratoire (Taylor, Uhing et al. 1985; Légaré, Drouin et al. 2001) permet une récupération d'environ 65 % des membranes plasmiques et ce, avec un minimum de contamination par les autres membranes cellulaires (Taylor, Uhing et al. 1985; Persson and Jergil 1992).

Enfin, une mesure de la quantité de protéines, lors des deux cinétiques, par immunobuvardage de type Western de cinq protéines liées à la voie de signalisation et à la désensibilisation du récepteur au glucagon a été effectuée. Une technique d'homogénéisation des protéines différente de celle utilisée pour la préparation des membranes plasmiques a été nécessaire pour mieux solubiliser les protéines peu solubles et en faciliter la migration sur le gel (Cadrin, Hovington et al. 2000; Merlen, Fabrega et al. 2006). À cela s'ajoute l'immunodétection des RG totaux dans la cinétique d'exercice grâce à un anticorps spécifique développé par l'équipe du Dr. Unson O'Brien de l'Université Rockefeller (Unson, Cypess et al. 1996).

## 6.2 Cinétique d'exercice et de récupération post-exercice

La majeure partie de l'analyse des résultats de radio-liaison et de suivi glucidique du protocole d'exercice appartenant à la thèse de doctorat d'Alexandre Melançon, je ne décrirai que brièvement les conclusions des mesures autres que les immunobuvardages.

Tout au long des périodes d'exercice et de récupération post-exercice, le niveau de glucose plasmatique se maintient dans la fourchette normale d'un sujet murin (Tableau 5.2). Ce maintien glycémique s'opère même en présence d'une diminution de 75 % des réserves hépatiques en glycogène (Tableau 5.3), confirmant ici, sans l'avoir directement mesuré, une contribution importante de la néoglucogenèse (Suh, Paik et al. 2007) à la production hépatique de glucose (PHG). La contribution de la néoglucogenèse à la PHG durant l'exercice provient en partie de l'augmentation significative à 201 % du ratio glucagon/insuline tel que suggéré par Moore (Figure 5.1) (Moore and Cherrington 1996). La stimulation de la PHG par le ratio G/I sur les mécanismes de glycogénolyse et néoglucogenèse a été montrée dans la littérature chez le rat dans des situations de stress intenses comme l'exercice prolongé, le jeûne ou l'exposition au froid (Guezennec, Nonglaton et al. 1988) ainsi que chez le chien (Wasserman, Lickley et al. 1984). Une augmentation du ratio G/I à l'exercice prolongé (Pex0) a aussi été rapportée dans la littérature. Une augmentations à 236 % des valeurs du contrôle après 180 minutes d'exercice chez le rat

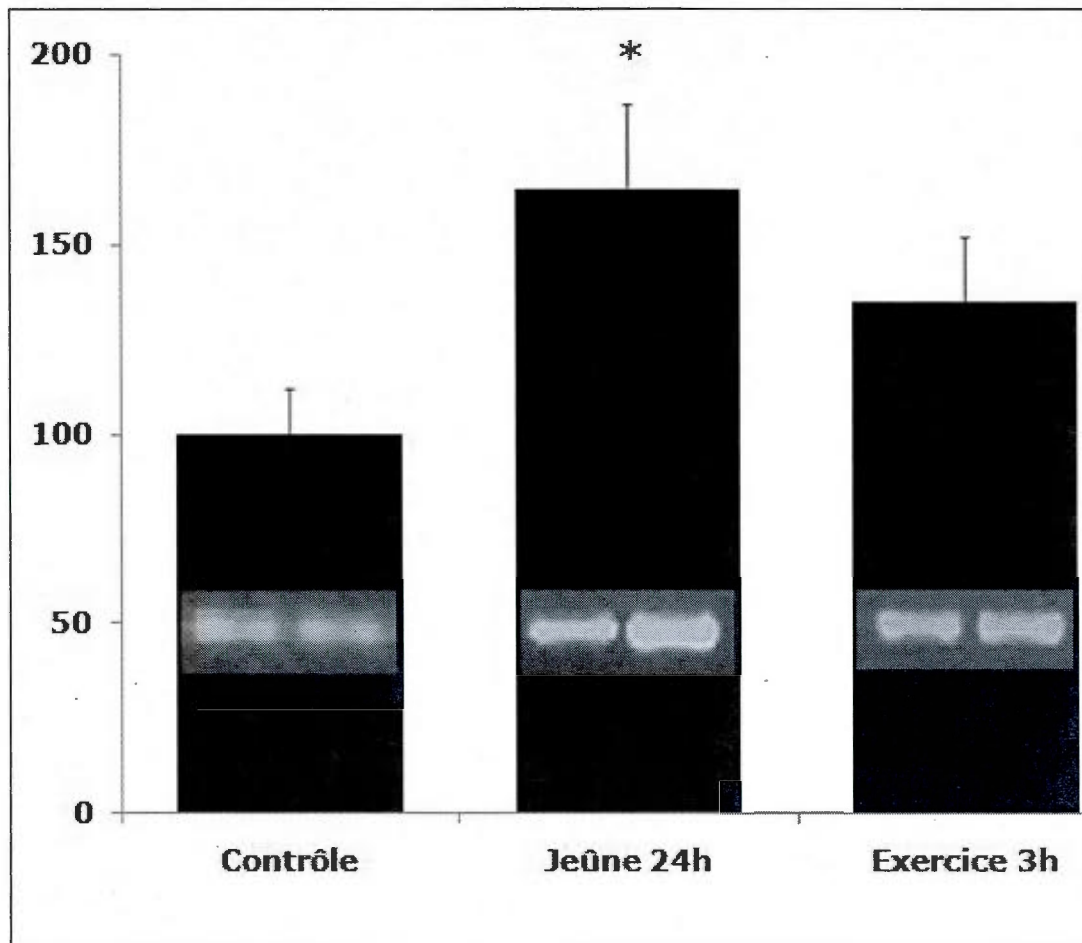
(Melançon 2005) et à 136 % après 120 minutes d'exercice (Friman, Ilback et al. 1991) permet d'établir une corrélation entre les deux phénomènes.

Le maintien de la glycémie est aussi présent lors de la période de réplétion des réserves de glycogène (103 % après 12 h post-exercice). Cette réplétion s'explique, entre autres, par une augmentation de la concentration d'insuline en post-exercice qui fait chuter le ratio G/I tel que présenté dans la littérature (Guezennec, Nonglaton et al. 1988; Friman, Ilback et al. 1991; Jungermann and Thurman 1992). La synthèse de glycogène est ici stimulée par une chute des niveaux de glucagon mais aussi par une forte hausse de l'insuline provoquant une diminution de 35 % des valeurs du ratio G/I face au contrôle, 12 h suivant la période d'exercice. Cette baisse du ratio revient 24 heures après l'exercice à la valeur du groupe contrôle.

La radio-liaison montre une augmentation statistiquement significative du nombre de RG sur la membrane plasmique des hépatocytes à 257 % des valeurs contrôle après 180 minutes d'exercice (Figure 5.2). La densité en RG membranaire, à son maximum après 180 minutes d'exercice, revient rapidement aux valeurs du groupe contrôle en post-exercice et ce dès une heure post-exercice. L'augmentation obtenue correspond aux valeurs répertoriés par les précédentes manipulations de notre équipe avec ce protocole (Melançon 2005). Une seule autre étude comparable présente dans la littérature, ne montre aucune augmentation significative de ses récepteurs membranaires, pour un exercice intense de plus courte durée, 60 minutes (Charbonneau, Melancon et al. 2005).

Récemment, notre laboratoire a mis en évidence que l'augmentation de la densité de RG sur la surface des hépatocytes n'était pas due à une hausse significative de l'ARNm codant pour le RG suivant une période d'exercice de 180 minutes ( $135 \pm 17\%$  du groupe contrôle à  $100 \pm 12\%$ ). Melançon et al. ont cependant observé une hausse significative de la quantité d'ARNm codant pour le RG lors d'un jeûne de 24 heures ( $165 \pm 22\%$  du groupe contrôle (Figure 6.1) (Melançon, Gagnon et al. 2011).





**Figure 6.1** Quantité relative en ARNm codant pour le RG hépatique (expression en % de GluR/ $\beta$ -actin) (adaptée de Melançon, Gagnon et al. 2011).

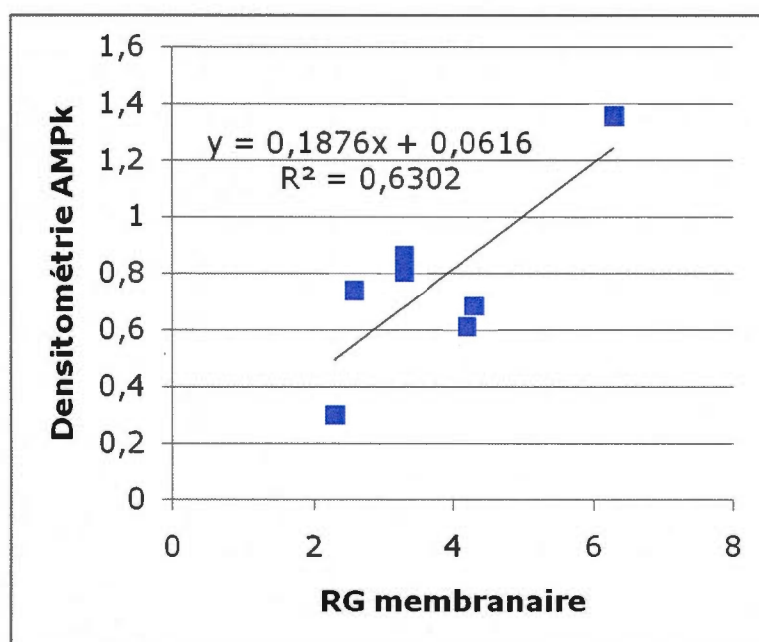
Les quantités relatives issues des immunobuvardages effectuées avec l'anticorps anti-RG sur les échantillons de protéines totales lors de l'exercice et de la récupération post-exercice donnent des résultats allant de pair avec l'hypothèse soulevée par notre groupe de recherche. Notre hypothèse est que, lors de l'exercice, l'augmentation de la densité en RG sur les membranes proviendrait d'un mécanisme de sensibilisation et de désensibilisation (externalisation/ internalisation). En effet, l'absence de changement significatif au niveau de la densité en RG suggère qu'aucune augmentation significative de la traduction ne survient durant la période d'exercice. Cette donnée concorde avec la littérature, soit qu'un stimulus ponctuel similaire à l'exercice n'induit aucune augmentation de la quantité en RG totale (Merlen, Fabrega et al. 2006).

Malgré de faibles fluctuations (Figure 4.3), la quantité totale de RG ne bouge pas de façon significative lors de l'exercice et en post-exercice suggérant que la synthèse du récepteur n'est pas responsable des changements obtenus au niveau de la densité des RG membranaires. En effet, la figure 4.3 présente une augmentation non-significative à Pex 3, correspondant à 145 % des valeurs contrôles en RG totaux. Cette augmentation, si elle était significative n'est pas suffisante pour compenser l'augmentation importante de la densité mesurée par radio-liaison au même moment (245 % d'augmentation de RG membranaire à Pex3).

Une étude récente a mis en évidence l'augmentation du ratio glucagon/insuline et le niveau d'expression de protéines clés et d'activation de certaines voies de signalisation dépendante de l'AMPc chez la souris (Madsen, Pedersen et al. 2008). Cette étude a montré qu'une hausse du ratio G/I induit par un régime concentré en protéines provoque une hausse de la synthèse de protéines jouant un rôle dans les cascades dépendantes de l'AMPc. Les protéines exprimées en plus grande quantité dans cette étude permettent de fournir de l'énergie telle ou l'activation de la gluconéogenèse.

La littérature sur le lien entre l'AMPK et sa liaison au glycogène dans le muscle est imposante (Jorgensen, Richter et al. 2006; Viollet, Foretz et al. 2006; Jorgensen and Rose 2008; Lim, Kola et al. 2010). Ces études montrent qu'une variation de la concentration de glycogène provoque une augmentation de l'activité et de la quantité en AMPK. Cette relation se confirme au niveau hépatique par nos résultats. Ces mêmes études montrent une réponse de l'AMPK à une variation des réserves énergétiques intracellulaires, cependant le mécanisme demeure inconnu, malgré qu'une régulation via les variations en ATP et AMP soit envisagée. Nos résultats indiquent qu'à l'exercice, l'augmentation des RG membranaires s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'AMPK pratiquement équivalente (Figure 6.2) et d'une diminution des réserves de glycogène et qu'à l'opposé, une augmentation du glycogène s'accompagne d'une diminution de l'expression en AMPK et en RG. La question qui surgit est : qui régit quoi? Il serait logique de placer l'AMPK entre le RG et le glycogène, mais qui, du RG en amont ou du glycogène en aval, intervient sur l'AMPK afin de faire varier l'expression de cette dernière. Aucune donnée n'existe

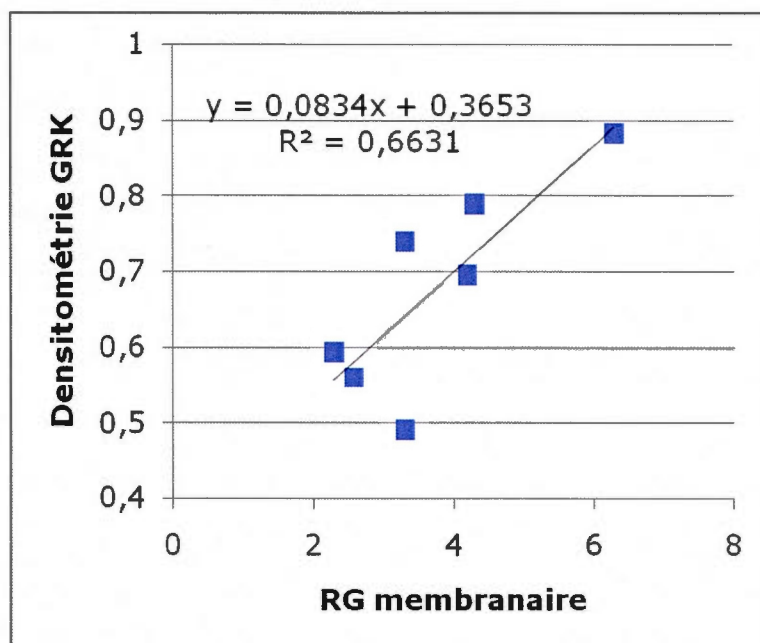
actuellement sur cette relation RG-AMPK-glycogène. Récemment, il a été montré chez des porcs ayant une mutation dans un gène responsable de l'expression de l'AMPK hépatique, que la mutation induisait une diminution de la réponse au glucagon ainsi qu'une augmentation des réserves de glycogène au repos (Granlund, Kotova et al. 2010). Cette variation est reproduite par la stimulation à AICAR, un puissant inhibiteur de l'activité de l'AMPK, qui lorsqu'ajouté aux cellules incubées avec AICAR diminue fortement la réponse à la demande énergétique et ce, *in vivo* (Pencek, Shearer et al. 2005) et *in vitro* (Corton, Gillespie et al. 1995).



**Figure 6.2** Quantité relative en AMPK en fonction de la densité en RG membranaires.

La compréhension du mécanisme de désensibilisation par le GRK explique les résultats des immunobuvardages de la GRK lors de l'exercice et de la récupération post-exercice. En effet, la GRK agit exclusivement sur un RG ayant lié son glucagon et dont la sous-unité  $\alpha$  s'est détachée du complexe récepteur/protéine G. Une augmentation significative de la densité en RG membranaire lors de l'exercice et par le fait même l'augmentation du nombre de liaisons récepteur/ligand implique un plus grand besoin en GRK. Ce mécanisme régissant le lien entre la quantité relative de GRK et celle de RG membranaire apparaît dans notre étude sous une

corrélation importante ( $R^2=0,66$ ) entre les données de densitométrie de la GRK et celles obtenues par radio-liaison des RG membranaires (Figure 6.3). Une seule étude effectuée chez le rat à l'exercice a montré une relation positive entre la densité en GRK et la mobilité de récepteur bêta-adrénérique, un autre récepteur couplé aux protéines G, dans les adipocytes (Ogasawara, Sanpei et al. 2006).



**Figure 6.3** Quantité relative en GRK en fonction de la densité en RG membranaires.

Les résultats obtenus pour la PKC montrent bien le rôle passif dans la phosphorylation du RG lors de l'exercice (Figure 4.6), un rôle actif aurait donné un graphique semblable à celui de la GRK. Cependant, l'augmentation de la quantité en PKC durant la période de récupération et particulièrement au moment où la densité en RG membranaire est à son plus faible (Pex3) l'intègre dans un mécanisme de désensibilisation. L'augmentation de l'expression de la PKC en période de désensibilisation a été montrée dans les travaux de Charbonneau dans le foie de rats à l'exercice (Charbonneau, Unson et al. 2007). Ces derniers ont obtenu une augmentation significative de la densité de PKC en même temps qu'une augmentation du nombre d'endosomes contenant des RG (Charbonneau, Unson et al. 2007). Le lien entre la PKC et la voie de dégradation impliquant ERK est connu depuis longtemps (Combarnous 2004). Les



résultats de récentes études montrent que l'activation de la voie de ERK par une modulation positive de la densité de PKC induit une modulation des récepteurs de type  $\beta$ -adrénergique et que cette activation puisse se faire par une modulation des concentrations de PKC (Shenoy, Drake et al. 2006; Huang, He et al. 2010).

Les niveaux d'expression de LKB1 et de  $\beta$ -arrestine sont demeurés significativement inchangés durant la cinétique per et post-exercice. Ceci permet de suggérer que l'expression de ces deux protéines n'est pas influencée par le stress induit par l'exercice. Pour ce qui est de la  $\beta$ -arrestine, nos résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature puisque sous stimulation de glucagon, d'agoniste ou d'antagoniste de ce dernier, l'expression de la  $\beta$ -arrestine ne change pas (Merlen, Fabrega et al. 2006). Aucune donnée n'existe sur l'effet de l'exercice sur l'expression de la LKB1 hépatique ou musculaire.

### 6.3 Cinétique de jeûne et de récupération post-jeûne

Les études sur le récepteur au glucagon en période de jeûne aigüe sont peu nombreuses dans la littérature (Longuet, Sinclair et al. 2008; Berglund, Lee-Young et al. 2009). La compréhension des phénomènes responsables des changements des propriétés de liaison induits par le jeûne doit reposer sur les autres modèles de stimuli physiologiques.

Tout au long des périodes de jeûne et de récupération post-jeûne, le niveau de glucose plasmatique se maintient dans la fourchette normale d'un sujet murin. Ce maintien glycémique s'opère même en présence d'une diminution de 96 % des réserves hépatiques en glycogène dès 12 h de jeûne. Cette déplétion extrêmement importante est en accord avec les résultats obtenues par d'autres chercheurs et ce dès 12 h suivi d'une concentration en glycogène quasi-nulle après 30 heures de jeûne (Aoki, Matsui et al. 2009). L'apport des mécanismes d'appoint de la PHG et de la néoglucogenèse est donc ici d'autant plus essentiel avec la durée du jeûne qui augmente.

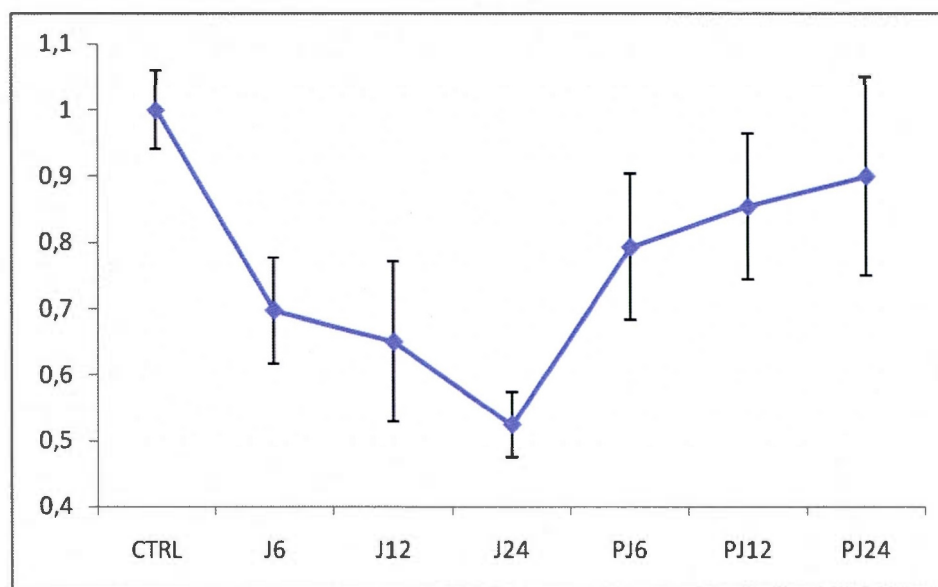


La variation de la masse chez les animaux au jeûne concorde avec les travaux de Chaouchi (Chaouchi 2004), soit une diminution de 6,8 % de la masse après 24 h de jeûne a été observée alors que nous obtenons 6,4 %. Cette perte de masse est renversée en récupération post-jeûne par une prise de masse plus importante que chez les rats du groupe contrôle pour une période de 24 heures. Un rat nourri subit une augmentation de masse de 1,8 % par jour, les animaux PJ24 subissent une augmentation de masse de 4,1 % en plus de reprendre leur 6,4 % initialement perdu. Cette augmentation de la prise de masse post-jeûne est bien documentée et correspond à nos données (Apostolou, Saidt et al. 1976; Flatt and Bailey 1984; Placanica, Faunce et al. 2002). Ce gain de masse post-jeûne confirme l'adage populaire comme quoi le jeûne est une mauvaise technique amaigrissante puisque la prise de poids post-jeûne est supérieure à la normale de gain de poids sans jeûne.

L'augmentation du ratio glucagon/insuline pendant le jeûne pourrait expliquer le maintien de la concentration normale du glucose plasmatique. Même sans une augmentation significative des concentrations en glucagon lors du jeûne, le ratio glucagon/insuline augmente à 221 % des valeurs du contrôle. Cette augmentation du ratio résulte principalement de la baisse de l'insuline de 73 % après 24 heures de jeûne. Il va sans dire que l'augmentation des RG membranaires pourrait contribuer à maintenir la PHG (Guezennec, Nonglaton et al. 1988).

La période de récupération post-jeûne entraîne une augmentation des réserves de glycogène de 56 % 24 heures après le jeûne face au contrôle, soit une augmentation de 9344 % entre la fin du jeûne de 24 heures et la fin de la période de récupération de 24 heures. Cette réplétion concorde avec l'étude de Goodman et al. qui ont dosé les niveaux de glycogène et de précurseur du glycogène dans la phase de réplétion post-jeûne 24 h chez le rat. Après trois heures post-jeûne, ils obtiennent une réplétion de glycogène hépatique de l'ordre de 30 % ainsi qu'une légère augmentation en lactate plasmatique (Goodman, Dietrich et al. 1990). Nous obtenons aussi une augmentation de lactate entre les animaux au jeûne et ceux post-jeûne (146 % entre J24 et PJ6). Cette augmentation du lactate s'explique par son rôle de substrat dans la néoglucogénèse (Palmer and Fournier 1997). En effet lorsque l'organisme ne peut plus compter sur la glycogénolyse à cause de la diminution en glycogène, le foie capte le lactate, provoquant une diminution plasmatique, afin de créer du glucose via la

néoglucogenèse. En reprenant la synthèse de glycogène en post-jeûne, grâce au retour de la nourriture, la glycogénolyse peut reprendre et donc la nécessité de la néoglucogenèse diminue, d'autant que la captation hépatique du lactate sanguin.



**Figure 6.4** Concentration en lactate plasmatique au jeûne (valeur arbitraire sur le contrôle).

La radio-liaison montre une augmentation significative du nombre de RG sur la membrane plasmique des hépatocytes de l'ordre de 165 % après 24 heures de jeûne (Figure 4.2). La densité semble élevée dès 6 heures per-jeûne, seulement un grand SEM (38 % de la valeur) vient brouiller la précision des résultats. L'augmentation des récepteurs obtenue est moins importante que celle obtenue dans les précédentes manipulations du laboratoire avec ce protocole qui obtenait une augmentation de 259 % (Melançon 2005).

Les densitométries issues des immunobuvardages avec l'anticorps anti-RG sur les protéines totales n'ont pas été effectuées au cours de ce projet de maîtrise. Cependant l'augmentation significative de la densité d'ARNm (Figure 6.1) codant pour le RG après une période de jeûne de 24 heures laisse entrevoir la présence d'une augmentation significative de la densité RG. La faible augmentation des récepteurs membranaires, en plus d'une augmentation de la

densité en ARNm codant pour le RG, n'exclut pas nécessairement le mécanisme de mobilité par sensibilisation et désensibilisation.

L'augmentation faible, mais néanmoins significative, de la densité en récepteurs membranaires avec le jeûne, pourrait expliquer l'absence de changement dans la densité des cinq protéines étudiées. En effet, aucune variation significative n'apparaît entre les différents temps au jeûne et en récupération post-jeûne. À notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature pour infirmer ou confirmer nos résultats. Un nombre de rats étudiés pour les groupes du jeûne plus faible que ceux de l'exercice peut aussi expliquer cette diminution de la précision des résultats.

Bien que non-significative, une tendance similaire aux résultats à l'exercice se dessine avec les densitométries de l'AMPK et la PKC. Le niveau d'expression de l'AMPK suit l'augmentation et la diminution des RG membranaires et ceux de la PKC augmentent avec la diminution des RG membranaires.

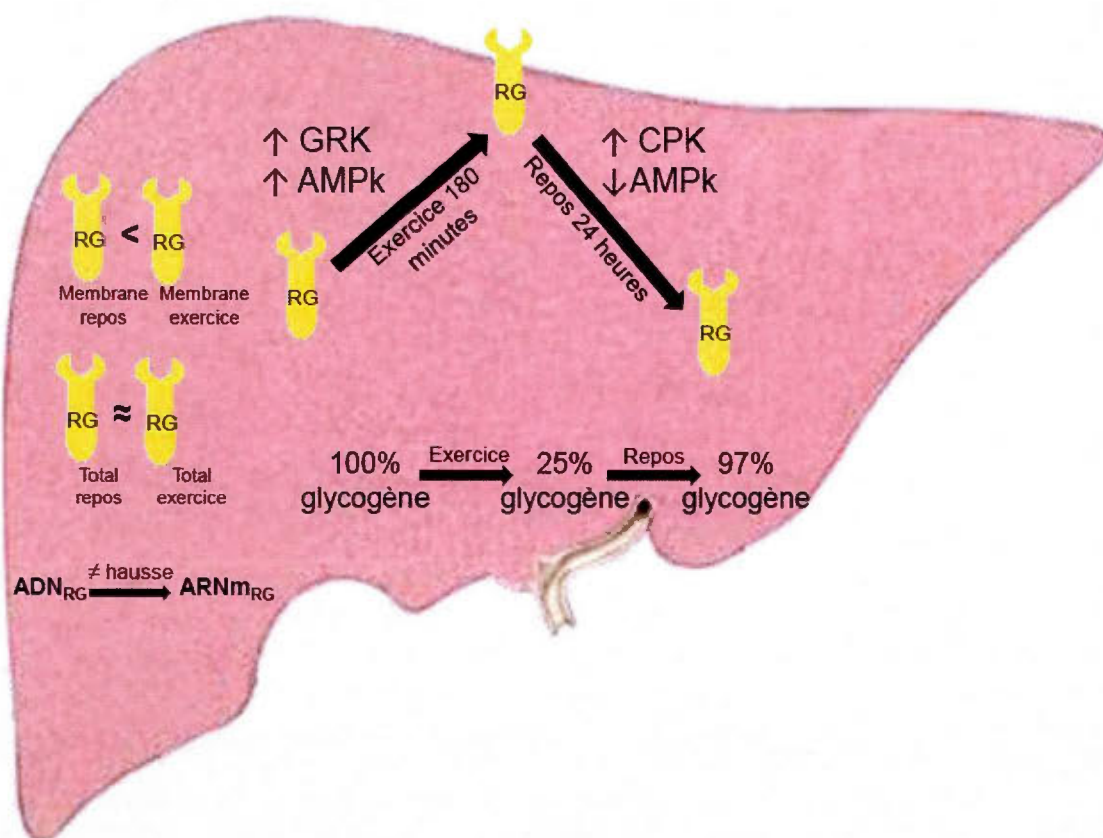
Les trois autres protéines présentent des graphiques de quantité relative très stables sans aucun changement du niveau d'expression et où aucune tendance claire ne peut être définie.

## 6.4 Résumé des implications et mécanismes probables

### 6.4.1 Exercice

La figure 6.5 illustre les changements survenant dans l'hépatocyte et nous permet d'élaborer une hypothèse sur le mécanisme de régulation du récepteur au glucagon. L'absence d'augmentation significative d'ARNm codant pour le RG (Melançon, Gagnon et al. 2011) ainsi que l'absence de changement significatif en RG totaux durant toute la période d'exercice et en post-exercice indiquent que l'exercice ne provoque pas une augmentation majeure de transcription du gène du RG. L'augmentation significative du nombre de récepteurs membranaires vient suggérer l'hypothèse du mécanisme de mobilité du RG; lors

de la période d'exercice les récepteurs sont externalisés via un mécanisme d'exocytose tandis que lors de la récupération et de réplétion des réserves de glycogène, diminuées en grande partie lors de l'exercice, provoquent une internalisation du récepteur via les mécanismes décrits par Calebiro et al. (Calebiro, Nikolaev et al. 2010). Selon notre hypothèse, la diminution du glycogène provoque une augmentation de la densité d'AMPK. Cette augmentation induit une exocytose des RG qui permet donc d'augmenter la réponse au glucagon augmentant ainsi la PHG par la néoglucogenèse malgré l'inhibition de deux gènes d'enzymes de la néoglucogenèse par l'AMPK. Lors du repos post exercice, la répression de l'AMPK par l'augmentation de l'insuline en plus de la diminution de glucagon provoque une diminution de la densité de l'AMPK.

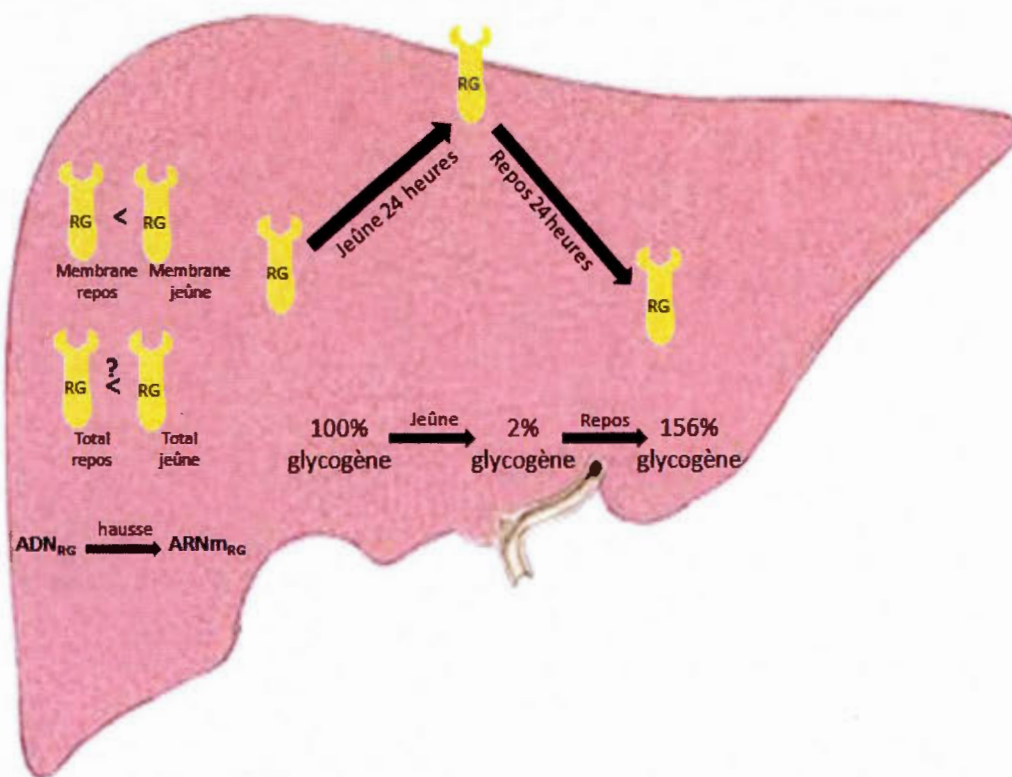


**Figure 6.5** Représentation schématique de l'effet de l'exercice sur le RG.



#### 6.4.2 Jeûne

La figure 6.6 illustre les changements survenant dans l'hépatocyte nous permettant d'élaborer une hypothèse sur le mécanisme de régulation du récepteur au glucagon lors de la cinétique de jeûne et de récupération post-jeûne. La présence d'augmentation significative d'ARNm codant pour le RG (Melançon, Gagnon et al. 2011) confirme que le jeûne provoque une augmentation de la transcription du gène du RG. Lors de la période de jeûne, l'augmentation significative du nombre de récepteurs membranaires, bien qu'inférieure à l'augmentation à l'exercice, pourrait aussi impliquer l'hypothèse du mécanisme de mobilité du RG. Les récepteurs seraient externalisés via un mécanisme d'exocytose tandis que la période de récupération et de réplétion des réserves glucidiques, diminuées en grande partie lors du jeûne, provoque une internalisation du récepteur via les mécanismes décrits dans la littérature, phosphorylation du récepteur par GRK/CPK, liaison à la  $\beta$ -arrestine et recrutement de clathrine (Calebiro, Nikolaev et al. 2010). Selon notre hypothèse, l'hépatocyte subit un mécanisme de sensibilisation/désensibilisation autant lors du jeûne que lors de l'exercice. Cependant puisque le stimulus est moins intense et surtout plus lent et plus long, les densités des protéines subissent des variations moins importantes puisque leur densité initiale suffit à mettre en place une contribution importante de la néoglucogenèse à la PHG. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'augmentation de la densité en RG membranaire est moins prononcée que pour l'exercice, de plus aucune augmentation statistiquement significative des quantités relatives de protéines étudiées n'apparaît à l'immunobuvardage contrairement à l'exercice. La différence entre les deux stimuli propose que deux systèmes de régulation différents agissent sur l'augmentation de la densité membranaire du RG. L'augmentation probable d'expression du RG lors du jeûne est une piste de solution sur le fonctionnement de cet autre mécanisme de régulation du RG au jeûne. Cependant, à notre connaissance, aucune donnée dans la littérature ne vient proposer des pistes de solution semblables avec le jeûne.



**Figure 6.6** Représentation schématique de l'effet du jeûne sur le RG.

### 6.5 Comparaison des résultats d'exercice et de jeûne

Ce qui apparaît principalement de nos deux cinétiques différentes est la distinction probable entre les deux réponses de la cellule à des stimuli différents ayant la même résultante sur les réserves de glycogène. En effet dans les deux cas, nous observons un maintien de la normoglycémie malgré une forte diminution des réserves de glycogène hépatique et ces stimuli provoquent une augmentation des RG membranaires suivie d'un retour aux valeurs normales lors de la période de récupération.

L'exercice qui se déroule dans un temps court provoque une forte augmentation des récepteurs membranaires et cela, sans provoquer de hausse de la traduction. Cette augmentation est accompagnée d'une augmentation de la quantité en protéines clés des mécanismes de signalisation ou de désensibilisation.



À l'opposé, le jeûne, durant une longue période, provoque une augmentation des RG membranaires mais en plus faible proportion. Cette augmentation est cependant accompagnée d'une hausse significative de l'ARNm codant pour le RG et donc probablement d'une hausse de la traduction. L'augmentation de la densité de RG membranaire au jeûne n'est, quant à elle, pas accompagnée d'une variation significative des différentes protéines clés identifiées avec l'exercice.

Les résultats de ce présent projet s'avèrent très nouveaux, et actuellement à notre connaissance aucune donnée n'est disponible dans la littérature pour comparer notre étude. À partir de nos résultats, il importe de poursuivre afin d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de la réponse commune entre le jeûne et l'exercice impliquant ou résultant d'une modulation des RG membranaires.

## 6.6 Perspectives de recherche

Tout d'abord, certains résultats s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre les premières étapes identifiées dans ce mémoire. Il importe de réaliser rapidement par immunobuvardage, la cinétique de quantité relative des récepteurs au glucagon dans les hépatocytes au jeûne afin de confirmer ou infirmer nos résultats sur les mécanismes de traduction de l'ARNm codant pour les RG dans l'explication de la réponse des RG lors du jeûne.

Plusieurs des protéines étudiées dans le cadre de ce projet étant des kinases « activables », il serait intéressant de déterminer par immunobuvardage le niveau de phosphorylation de ces protéines aux cours des deux cinétiques. Ces données permettraient d'ajouter une variable qualitative à nos données principalement quantitatives et ainsi dresser un portrait d'activation en plus de l'expression lors de ces deux cinétiques d'exercice et de jeûne. En effet l'activité d'une protéine kinase est directement liée à sa fonction, la quantité est donc un point important mais l'activité kinasique est essentiel à une bonne compréhension du phénomène.

Dans le même ordre d'idée, des immunobuvardages de type Northern pourraient donner une idée qualitative sur les variations de densité d'ARNm transcrites lors de la cinétique d'exercice/post-exercice et jeûne/post-jeûne permettant de confirmer les données obtenues lors des immunobuvardages de type Western de ce projet.

Afin d'établir l'importance de chacune des protéines dans les mécanismes d'internalisation et d'externalisation, une étude *in vitro* avec des hépatocytes knock-in knock-out des protéines cibles pourrait être effectuée. Cette étude permettrait de voir l'effet d'une surabondance ou d'une carence en protéines cibles lors, par exemple, d'un bonus de glucagon ou d'insuline stimulant les mécanismes de mobilité du RG.

## 6.7 Conclusion

La grande nouveauté de cette étude est la cinétique per et post stimuli physiologique. Le peu d'études disponibles dans la littérature établissent généralement un type de stimulation et ne suivent la cinétique que pendant ou après le stimulus physiologique. Un suivi global pendant et après l'exercice intense ou pendant et après un jeûne prolongé est une nouveauté qui permet de suivre les variations de l'ensemble des résultats et de comparer les deux cinétiques une à l'autre.

Une période d'exercice induit chez des rats sains une augmentation significative de 244 % des récepteurs membranaires alors qu'il n'y a aucune variation significative de la densité des récepteurs totaux. Ces données permettent de confirmer l'hypothèse d'un mécanisme de sensibilisation/désensibilisation des récepteurs au glucagon expliquant cette grande mobilité. Le mécanisme de sensibilisation apparaît en même temps qu'une augmentation des densités d'AMPK et de GRK de l'ordre de 183 et 158 % respectivement. Le mécanisme de désensibilisation quant à lui s'opère simultanément à une augmentation des expressions de PKC de 207 % et une diminution d'AMPK de l'ordre de 60 %.

Une période de jeûne prolongé induit chez des rats sains une augmentation significative de 165 % des récepteurs membranaires. Cette augmentation n'est accompagnée d'aucun changement significatif dans l'expression des protéines étudiées ouvrant la voie à la synthèse de l'ARNm pour contribuer à l'augmentation des RG membranaires.

Même si les mécanismes derrière ces deux réponses commencent à peine à être identifiés, le foie présente une capacité d'adaptation importante en réponse à l'exercice et au jeûne.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ahlborg, G. and P. Felig (1982). "Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise". J Clin Invest **69**(1): 45-54.
- Alford, F. P., S. R. Bloom, et al. (1974). "Glucagon control of fasting glucose in man". Lancet **2**(7887): 974-977.
- Aller, M. A., J. L. Arias, et al. (2008). "Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response". Fibrogenesis Tissue Repair **1**(1): 6.
- Aoki, K., J. Matsui, et al. (2009). "Role of the liver in glucose homeostasis in PI 3-kinase p85alpha-deficient mice". Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E842-853.
- Apostolou, A., L. Saidt, et al. (1976). "Effect of overnight fasting of young rats on water consumption, body weight, blood sampling, and blood composition". Lab Anim Sci **26**(6 Pt 1): 959-960.
- Authier, F. and B. Desbuquois (2008). "Glucagon receptors". Cell Mol Life Sci **65**(12): 1880-1899.
- Authier, F., B. Desbuquois, et al. (1992). "Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver". Endocrinology **131**(1): 447-457.
- Barzilai, N., D. Massillon, et al. (1995). "Effects of fasting on hepatic and peripheral glucose metabolism in conscious rats with near-total fat depletion". Biochem J **310** ( Pt 3): 819-826.
- Bell, G. I., R. Sanchez-Pescador, et al. (1983). "Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene". Nature **304**(5924): 368-371.
- Benovic, J. L., L. J. Pike, et al. (1985). "Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein". J Biol Chem **260**(11): 7094-7101.

- Berglund, E. D., R. S. Lee-Young, et al. (2009). "Hepatic energy state is regulated by glucagon receptor signaling in mice". J Clin Invest **119**(8): 2412-2422.
- Bernard, C. (1857). "Sur le mécanisme physiologique de la formation de sucre dans le foie". C. R. hebd. sci **44**: 578-586.
- Bonjorn, V. M., M. G. Latour, et al. (2002). "Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon". J Appl Physiol **92**(1): 188-194.
- Boudeau, J., A. F. Baas, et al. (2003). "MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm". EMBO J **22**(19): 5102-5114.
- Boudeau, J., J. W. Scott, et al. (2004). "Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex". J Cell Sci **117**(Pt 26): 6365-6375.
- Bright, N. J., D. Carling, et al. (2008). "Investigating the regulation of brain-specific kinases 1 and 2 by phosphorylation". J Biol Chem **283**(22): 14946-14954.
- Buggy, J. J., R. O. Heurich, et al. (1997). "Role of the glucagon receptor COOH-terminal domain in glucagon-mediated signaling and receptor internalization". Diabetes **46**(9): 1400-1405.
- Cadrin, M., H. Hovington, et al. (2000). "Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver". J Hepatol **33**(2): 199-207.
- Calebiro, D., V. O. Nikolaev, et al. (2010). "Signaling by internalized G-protein-coupled receptors". Trends Pharmacol Sci **31**(5): 221-228.
- Camacho, R. C., E. P. Donahue, et al. (2006). "Energy state of the liver during short-term and exhaustive exercise in C57BL/6J mice". Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E405-408.
- Carlson, C. L. and W. W. Winder (1999). "Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise". J Appl Physiol **86**(2): 669-674.
- Chaouchi, A. (2004). Compartimentation et suivi de la synthèse deglycogène hépatique. Sciences de l'activité physique. Trois-Rivières, UQTR. **Maîtrise**.

- Charbonneau, A., A. Melancon, et al. (2005). "Alterations in hepatic glucagon receptor density and in G $\alpha$  and G $\alpha$ 2 protein content with diet-induced hepatic steatosis: effects of acute exercise". Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(1): E8-14.
- Charbonneau, A., C. G. Unson, et al. (2007). "High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise". J Physiol **579**(Pt 1): 255-267.
- Cheng, A., N. Dube, et al. (2002). "Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction". Eur J Biochem **269**(4): 1050-1059.
- Christophe, J. (1995). "Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses". Biochim Biophys Acta **1241**(1): 45-57.
- Combarnous, Y. (2004). Communications et signalisations cellulaires. Paris, Lavoisier.
- Corton, J. M., J. G. Gillespie, et al. (1994). "Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response". Curr Biol **4**(4): 315-324.
- Corton, J. M., J. G. Gillespie, et al. (1995). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?" Eur J Biochem **229**(2): 558-565.
- Cryer, P. E. (2008). "Hypoglycemia: still the limiting factor in the glycemic management of diabetes". Endocr Pract **14**(6): 750-756.
- Diviani, D., A. L. Lattion, et al. (1997). "Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the  $\alpha$ 1B-adrenergic receptor". J Biol Chem **272**(45): 28712-28719.
- Drouin, R., G. Robert, et al. (2004). "Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats". Metabolism **53**(8): 1027-1031.
- Dzimiri, N. (1999). "Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease". Pharmacol Rev **51**(3): 465-501.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling". Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.



- Ferguson, S. S. and M. G. Caron (1998). "G protein-coupled receptor adaptation mechanisms". Semin Cell Dev Biol **9**(2): 119-127.
- Flatt, P. R. and C. J. Bailey (1984). "Dietary components and plasma insulin responses to fasting and refeeding in genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice". Br J Nutr **51**(3): 403-413.
- Frandsen, E. K., L. Thim, et al. (1985). "Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21)". J Biol Chem **260**(12): 7581-7584.
- Friman, G., N. G. Ilback, et al. (1991). "Metabolic responses to swimming exercise in Streptococcus pneumoniae infected rats". Med Sci Sports Exerc **23**(4): 415-421.
- Fujii, N., N. Jessen, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport". Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(5): E867-877.
- Fujii, Y., B. W. Keene, et al. (2006). "Coil occlusion of residual shunts after surgical closure of patent ductus arteriosus". Vet Surg **35**(8): 781-785.
- Gerich, J. E. (2010). "Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications". Diabet Med **27**(2): 136-142.
- Goodman, M. N., R. Dietrich, et al. (1990). "Formation of gluconeogenic precursors in rat skeletal muscle during fasted-refed transition". Am J Physiol **259**(4 Pt 1): E513-516.
- Granlund, A., O. Kotova, et al. (2010). "Effects of exercise on muscle glycogen synthesis signalling and enzyme activities in pigs carrying the PRKAG3 mutation". Exp Physiol **95**(4): 541-549.
- Guezennec, C. Y., J. Nonglaton, et al. (1988). "Hormonal and metabolic response to physical exercise, fasting and cold exposure in the rat. Effects on ketogenesis in isolated hepatocytes". Eur J Appl Physiol Occup Physiol **57**(1): 114-119.
- Hansen, L. H., J. Gromada, et al. (1998). "Glucagon-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors". Am J Physiol **274**(6 Pt 1): C1552-1562.
- Hardie, D. G., S. A. Hawley, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept". J Physiol **574**(Pt 1): 7-15.

- Hardie, D. G. and K. Sakamoto (2006). "AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle". Physiology (Bethesda) **21**: 48-60.
- Hardie, D. G., J. W. Scott, et al. (2003). "Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system". FEBS Lett **546**(1): 113-120.
- Hoene, M., R. Lehmann, et al. (2009). "Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise". J Physiol **587**(Pt 1): 241-252.
- Holst, J. J. (2007). "The physiology of glucagon-like peptide 1". Physiol Rev **87**(4): 1409-1439.
- Horman, S., D. Vertommen, et al. (2006). "Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491". J Biol Chem **281**(9): 5335-5340.
- Huang, H., X. He, et al. (2010). "Bombyx adipokinetic hormone receptor activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via G protein-dependent PKA and PKC but beta-arrestin-independent pathways". Biochemistry **49**(51): 10862-10872.
- Iyengar, R., J. T. Herberg, et al. (1984). "Characterization of the hepatic glucagon receptor". J Recept Res **4**(1-6): 247-265.
- Jelinek, L. J., S. Lok, et al. (1993). "Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor". Science **259**(5101): 1614-1616.
- Jensen, T. E., J. F. Wojtaszewski, et al. (2009). "AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient?" Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 155-174.
- Jorgensen, S. B., E. A. Richter, et al. (2006). "Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise". J Physiol **574**(Pt 1): 17-31.
- Jorgensen, S. B. and A. J. Rose (2008). "How is AMPK activity regulated in skeletal muscles during exercise?" Front Biosci **13**: 5589-5604.
- Jungermann, K. and R. G. Thurman (1992). "Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates". Enzyme **46**(1-3): 33-58.

- Katajisto, P., T. Vallenius, et al. (2007). "The LKB1 tumor suppressor kinase in human disease". Biochim Biophys Acta **1775**(1): 63-75.
- Katoh, Y., H. Takemori, et al. (2006). "Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade". FEBS J **273**(12): 2730-2748.
- Kiraly, M. A., H. E. Bates, et al. (2007). "Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise". Metabolism **56**(6): 732-744.
- Kojima, Y., H. Miyoshi, et al. (2007). "Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling". J Biol Chem **282**(32): 23532-23540.
- Krilov, L., A. Nguyen, et al. (2008). "Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton". Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1230-1237.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation". Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 289-319.
- Landau, B. R., J. Wahren, et al. (1996). "Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state". J Clin Invest **98**(2): 378-385.
- Lavoie, C., F. Ducros, et al. (1997). "Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis". Can J Physiol Pharmacol **75**(1): 26-35.
- Légaré, A., R. Drouin, et al. (2001). "Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats". Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(1): E193-196.
- Lim, C. T., B. Kola, et al. (2010). "AMPK as a mediator of hormonal signalling". J Mol Endocrinol **44**(2): 87-97.
- Lodish, Berk, et al. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. de. Boeck: 301-315.
- Lohse, M. J., S. Andexinger, et al. (1992). "Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems". J Biol Chem **267**(12): 8558-8564.

- Longuet, C., E. M. Sinclair, et al. (2008). "The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting". Cell Metab **8**(5): 359-371.
- Madsen, L., L. M. Pedersen, et al. (2008). "cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids". J Biol Chem **283**(11): 7196-7205.
- Marks, D. B., A. D. Marks, et al. (1996). Basic medical biochemistry: a clinical approach. USA, Lippincott Williams et Wilkins.
- Mayo, K. E., L. J. Miller, et al. (2003). "International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family". Pharmacol Rev **55**(1): 167-194.
- Melançon, A. (2005). Augmentation de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon induite par une période de jeûne et d'exercice. Biophysique et biologie cellulaire. Trois-Rivières, UQTR. **Maîtrise**.
- Melançon, A., V. Gagnon, et al. (2011). Effect of exercise and fasting on binding properties and expression of rat liver glucagon receptor. U. d. Q. à Trois-Rivières. Canada.
- Merlen, C., S. Fabrega, et al. (2006). "Glucagon-mediated internalization of serine-phosphorylated glucagon receptor and Gs $\alpha$  in rat liver". FEBS Lett **580**(24): 5697-5704.
- Milburn, C. C., J. Boudeau, et al. (2004). "Crystal structure of MO25  $\alpha$  in complex with the C terminus of the pseudo kinase STE20-related adaptor". Nat Struct Mol Biol **11**(2): 193-200.
- Moller, D. E. (2001). "New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome". Nature **414**(6865): 821-827.
- Momcilovic, M., S. P. Hong, et al. (2006). "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro". J Biol Chem **281**(35): 25336-25343.
- Moore, M. C. and A. D. Cherrington (1996). "Regulation of net hepatic glucose uptake: interaction of neural and pancreatic mechanisms". Reprod Nutr Dev **36**(4): 399-406.
- Moore, M. C., A. D. Cherrington, et al. (2003). "Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal". Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **17**(3): 343-364.

- Moore, M. C., C. C. Connolly, et al. (1998). "Autoregulation of hepatic glucose production". Eur J Endocrinol **138**(3): 240-248.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, et al. (1999). "Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization". J Biol Chem **274**(45): 32248-32257.
- Ogasawara, J., M. Sanpei, et al. (2006). "Beta-adrenergic receptor trafficking by exercise in rat adipocytes: roles of G-protein-coupled receptor kinase-2, beta-arrestin-2, and the ubiquitin-proteasome pathway". FASEB J **20**(2): 350-352.
- Palmer, T. N. and P. A. Fournier (1997). "Replenishment of muscle glycogen after high-intensity exercise: a role for intramuscular lactate glyconeogenesis?" Biochem Soc Trans **25**(1): 25-30.
- Park, H., V. K. Kaushik, et al. (2002). "Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise". J Biol Chem **277**(36): 32571-32577.
- Passonneau, J. V. and V. R. Lauderdale (1974). "A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues". Anal Biochem **60**(2): 405-412.
- Pearse, B. M. (1976). "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles". Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1255-1259.
- Pencek, R. R., J. Shearer, et al. (2005). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside causes acute hepatic insulin resistance in vivo". Diabetes **54**(2): 355-360.
- Persson, A. and B. Jergil (1992). "Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning". Anal Biochem **204**(1): 131-136.
- Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002). "Seven-transmembrane receptors". Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 639-650.
- Pippig, S., S. Andexinger, et al. (1995). "Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization". Mol Pharmacol **47**(4): 666-676.



- Placanica, J. L., G. J. Faunce, et al. (2002). "The effect of fasting on attentional biases for food and body shape/weight words in high and low Eating Disorder Inventory scorers". Int J Eat Disord **32**(1): 79-90.
- Polekhina, G., A. Gupta, et al. (2003). "AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen". Curr Biol **13**(10): 867-871.
- Premont, R. T. and R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins". Annu Rev Physiol **69**: 511-534.
- Premont, R. T., J. Inglese, et al. (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors". FASEB J **9**(2): 175-182.
- Prevost, M. (1999). "Glycogen supercompensation enhances athletic performance". J perf Enhanc **1**: 1-10.
- Rodbell, M., H. M. Krans, et al. (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. 3. Binding of glucagon: method of assay and specificity". J Biol Chem **246**(6): 1861-1871.
- Ruderman, N. B., H. Park, et al. (2003). "AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise". Acta Physiol Scand **178**(4): 435-442.
- Sanz, P. (2008). "AMP-activated protein kinase: structure and regulation". Curr Protein Pept Sci **9**(5): 478-492.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, et al. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin". Science **310**(5754): 1642-1646.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor". J Biol Chem **281**(2): 1261-1273.
- Soskin, S., H. E. Essex, et al. (1938). "the mechanism of the regulation of blood sugar by the liver". Am J Physiol **124**: 558-567.
- Suh, S. H., I. Y. Paik, et al. (2007). "Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise". Mol Cells **23**(3): 272-279.

- Taylor, D., R. J. Uding, et al. (1985). "Insulin and epidermal growth factor do not affect phosphoinositide metabolism in rat liver plasma membranes and hepatocytes". J Biol Chem **260**(4): 2011-2014.
- Unson, C. G., A. M. Cypess, et al. (1996). "Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagon receptor block glucagon binding". Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 310-315.
- Viollet, B., M. Foretz, et al. (2006). "Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders". J Physiol **574**(Pt 1): 41-53.
- Viollet, B., R. Mounier, et al. (2007). "Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders". Diabetes Metab **33**(6): 395-402.
- Wang, D. A., J. Ji, et al. (2002). "In situ immobilization of proteins and RGD peptide on polyurethane surfaces via poly(ethylene oxide) coupling polymers for human endothelial cell growth". Biomacromolecules **3**(6): 1286-1295.
- Warhen, J., Felig, P., Ahlborg, G., Jorfeldt, L., (1971). "Glucose metabolism during leg exercise in man". J. Clin. Invest **50**: 2715-2725.
- Wasserman, D. H. (1995). "Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state". Annu Rev Physiol **57**: 191-218.
- Wasserman, D. H. (2009). "Four grams of glucose". Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(1): E11-21.
- Wasserman, D. H., H. L. Lickley, et al. (1984). "Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs". J Clin Invest **74**(4): 1404-1413.
- Wasserman, D. H., J. A. Spalding, et al. (1989). "Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work". Am J Physiol **257**(1 Pt 1): E108-117.
- Watanabe, J., K. Kanai, et al. (1988). "Glucagon receptors in endothelial and Kupffer cells of mouse liver". J Histochem Cytochem **36**(9): 1081-1089.

- Wilmore, J. H., Costill, D.L., Larry Kenney, W. (2008). Physiology of Sports and Exercise. f. edition, Human kinetics: 49-50.
- Wu, C. S. and G. C. Chen (1989). "Adsorption of proteins onto glass surfaces and its effect on the intensity of circular dichroism spectra". Anal Biochem **177**(1): 178-182.
- Ylikorkala, A., E. Avizienyte, et al. (1999). "Mutations and impaired function of LKB1 in familial and non-familial Peutz-Jeghers syndrome and a sporadic testicular cancer". Hum Mol Genet **8**(1): 45-51.
- Ylikorkala, A., D. J. Rossi, et al. (2001). "Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice". Science **293**(5533): 1323-1326.
- Zagorska, A., M. Deak, et al. (2010). "New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion". Sci Signal **3**(115): ra25.